

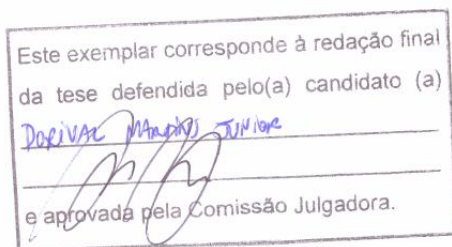
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



DORIVAL MARTINS JUNIOR

**“ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA VIOLACEÍNA PURA OU  
EM NANOFORMULAÇÃO”**



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética de Microorganismos.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Brocchi.

Campinas, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

M366a

Martins Junior, Dorival

Atividade antimicrobiana da violaceína pura ou em nanoformulação / Dorival Martins Junior. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Marcelo Brocchi.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Nanopartículas poliméricas. 2. Violaceína. 3. Agentes antibacterianos. 4. *Staphylococcus aureus*. I. Brocchi, Marcelo, 1967-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Antibacterial activity of free or nanoparticles-loaded violacein.

**Palavras-chave em inglês:** Polymeric nanoparticles; Violacein; Antibacterial agents; *Staphylococcus aureus*.

**Área de concentração:** Genética de Microorganismos.

**Titulação:** Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Banca examinadora:** Marcelo Brocchi, Elsa Masae Mamizuka, Marcelo Lancelotti.


**Data da defesa:** 02/03/2009.

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular.

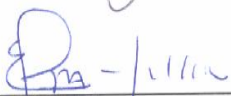
Campinas, 02 de março de 2009.

### BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Brocchi (Orientador) - Titular

  
Assinatura

Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka - Titular

  
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti - Titular

  
Assinatura

Profa. Dra. Claudia Maria Leite Maffei (Suplente)

---

Assinatura

Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa (Suplente)

---

Assinatura

**Aos meus pais, irmãos e amigos.**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus familiares pelo apoio e carinho incondicional mesmo nas horas mais difíceis deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Brocchi pela oportunidade e liberdade para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Nelson Durán pelo enorme apoio e suporte, ajuda em guiar meu crescimento e desenvolvimento profissional desde a iniciação científica e valiosas idéias para o andamento e conclusão deste trabalho.

À Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka pelas produtivas sugestões e participação no exame de defesa de tese.

Ao Prof. Dr. Marcelo Lancellotti pelas sugestões para melhoria deste trabalho e por sua presença nos exames de qualificação de área, pré-banca e defesa de tese.

Ao Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira pela sua participação no exame de pré-banca.

Ao Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro pela sua participação no exame de qualificação de área.

Ao Prof. Dr. Marcelo Palma Sircilli pela sua participação no exame de qualificação de área.

Aos colaboradores do Instituto de Química - Prof. Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveira, Dra. Amedea Seabra, Regiana da Silva e Maíra Martins - pela parceria, troca de conhecimentos e desenvolvimento de valiosos trabalhos paralelos.

Aos colaboradores do Laboratório de Cultura de Células e Biofármacos – Profa. Dra. Patrícia da Silva Melo e Lucas Frungillo – pelo desenvolvimento de projetos paralelos e troca de conhecimentos que ajudaram a ampliar o espectro da linha de pensamento do presente trabalho. Aos amigos do grupo do Laboratório de Genômica e

Biologia Molecular Bacteriana – André, Bela, Bruna, Dãa..., Du, Evandro, Fernanda, Gerson, Guilherme, Lu Cazoto, Lu Chimetto, Lu Hollanda – pelo apoio nos momentos difíceis, ajuda em ensinar e compartilhar técnicas, conhecimentos e histórias, convivência, *happy hours*, comemorações, enfim, por todos os excelentes momentos desses 2 anos.

Aos amigos do grupo do Laboratório de Química Biológica – Ana Paula, Chico, Livia, Marcela, Priscyla, Zaine e os demais estudantes – pelo apoio, disponibilidade e paciência em ajudar, ensinar e comemorar as vitórias ao longo desse caminho.

Aos meus grandes amigos – Bruno, Fabio, Livia – pelo suporte, risadas e todos os momentos de dedicação e amizade incondicional e, especialmente, pela torcida quando esse momento enfim chegou.

Às secretárias da Pós-Graduação – Lourdes e Silvia – pela paciência e auxílio para os procedimentos de defesa dessa tese.

Aos funcionários e docentes do Instituto de Biologia e Química pelo seu auxílio, colaboração e parcerias no decorrer de toda essa trajetória.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte técnico e financeiro.

A todos vocês que acompanharam direta ou indiretamente minha trajetória, muito obrigado!

## ÍNDICE

Índice	pg. 7
Apêndice 1	pgs. 8-9
Apêndice 2	pgs. 10-11
Apêndice 3	pgs. 12-13
Resumo	pgs. 14-15
Abstract	pg. 16
Introdução	pgs. 17-27
Objetivo geral	pg. 28
Objetivos específicos	pg. 28
Justificativa	pg. 29
Metodologia	pgs. 29-40
Resultados e discussão	pgs. 41-61
Conclusões	pgs. 61-62
Referências bibliográficas	pgs. 63-69
Anexos	pgs. 70-72

## APÊNDICE 1: ABREVIACÕES

Akt: proteína envolvida da sinalização antiapoptótica de células eucarióticas (protooncogene).

ANOVA: teste estatístico de análise de variância.

ARN: ácido ribonucleico (do inglês, RNA ou *ribonucleic acid*).

ATCC: linhagem precedente da coleção de culturas americanas (do inglês, *american type culture collection*).

BEC: clone endêmico brasileiro.

C3b e C3bi: fragmentos derivados da clivagem do elemento C3b do sistema complemento que agem com função opsonizante em antígenos.

*ccrA/ccrB* ou *ccrC*: recombinases do cassete cromossômico.

CLF: concentração letal fracionada.

CMI: concentração mínima inibitória (do inglês, MIC ou *minimal inhibitory concentration*).

D-Ala: isômero dextrógiro aminoácido alanina.

D-Lac: isômero dextrógiro do ácido láctico ionizado (lactato).

DMSO: dimetil-sulfóxido.

EDL: espalhamento dinâmico de luz (do inglês, PCS ou *photon correlation spectroscopy*).

FN- $\kappa$ B: fator nuclear  $\kappa$ B.

FNT-1: fator de necrose tumoral 1.

HL60: linhagem celular de leucemia mielóide humana.

HT-29: linhagem celular de câncer de cólon humano.

IgG: Imunoglobulina G.



PLP: transpeptidase ligadora de penicilina (do inglês, PBP ou *penicillin binding protein*).

PLP2A: subforma da transpeptidase ligadora de penicilina que possui baixa afinidade por  $\beta$ -lactâmios.

PLA: poli-lactato.

PLG: poli-glicolato.

PLGA: co-polímero de lactato e glicolato, poli-(lactídeo-co-glicolídeo).

PCL: poli- $\epsilon$ -caprolactona.

PLCL: poli-(lactídeo-co-caprolactona).

PLGA 50:50 - poli-D,L-(Lactídeo-co-Glicolídeo) 50:50 (D,L-PLGA 50:50, Massa Molar = 40.000 - 75.000 kDa).

Pluronic F68 - [poli(óxido etileno)-poli(óxido propileno)-poli(óxido etileno)] Massa Molar = 8.400 kDa).

PVA - álcool poli-vinílico (Massa Molar = 30.000-70.000 kDa).

RMN – Ressonância magnética nuclear.

SAIV: *Staphylococcus aureus* resistente intermediário à vancomicina (do inglês, VISA ou *vancomycin intermediary-resistant Staphylococcus aureus*).

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (do inglês, MRSA ou *methicilin-resistant Staphylococcus aureus*).

SARM-AC: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina associado às comunidades (do inglês, CA-MRSA ou *community-associated methicilin-resistant Staphylococcus aureus*).

SASM: *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (do inglês, MSSA ou *methicilin-sensible Staphylococcus aureus*).

SARV: *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (do inglês, VRSA ou *vancomycin resistant Staphylococcus aureus*).

SCCmec: cassete cromossômico estafilocócico contendo o gene *mec*.

SDS: dodecil-sulfato de sódio.

Tween 40: monopalmitato de poli-(oxietileno)-sorbitana.

UV-Vis – Espectoscopia em Ultra-Violeta visível.

$\epsilon$ : Coeficiente de extinção molar.

$r^2$ : coeficiente de regressão linear.

## APÊNDICE 2: UNIDADES DE MEDIDA

### Comprimento:

$\mu\text{m}$ : micrômetro ( $10^{-6}$  m);

nm: nanômetro ( $10^{-9}$  m);

*mesh*: unidade de porosidade de sílica em pó.

### Concentração:

M: concentração molar ( $\text{mol.L}^{-1}$ );

$\mu\text{M}$ : milimolar ( $10^{-6}$  M);

m/v: proporção massa:volume ou concentração comum ( $\text{g.L}^{-1}$ );

v/v: proporção volume:volume.

### Massa:

kg: quilograma ( $10^3$  g).

g: grama

ng: nanograma ( $10^{-9}$  g).

Potencial elétrico:

mV: milivolt ( $10^{-3}$  V).

Potencial eletroquímico:

pH: potencial hidrogeniônico, dado por  $\text{pH} = -\log A_{\text{H}^+}$ , onde  $A_{\text{H}^+}$  corresponde à atividade dos íons hidrogênio em solução aquosa.

Recuperação de células bacterianas viáveis:

ufc: Unidades formadoras de colônia.

Volume:

mL: mililitro ( $10^{-3}$  L);

$\mu\text{L}$ : microlitro ( $10^{-6}$  L).

Tempo:

min: minuto;

h: hora;

d: dia.

Velocidade de centrifugação:

rpm: rotações por minuto.

### APÊNDICE 3: MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES:

#### ASM: meio ágar manitol-salgado (Oxoid, seletivo para *Staphylococci spp.*)

- 0,4% de peptona bacteriológica (m/v);
- 0,2% de extrato de levedura (m/v);
- 0,4% de hidrolisado enzimático de caseína (m/v);
- 0,1% de extrato nutritivo (m/v);
- 1% de D-manitol (m/v);
- 7% de cloreto de sódio (m/v);
- 0,00083% de vermelho de fenol (m/v);
- 1,5% de ágar bacteriológico (m/v);
- 1 L de água destilada;
- pH final = 7,4.

#### CN: meio caldo nutriente

- 0,5% de peptona bacteriológica (m/v);
- 0,25% de extrato de levedura (m/v);
- 1 L de água destilada; pH final = 7,4.

#### MH caldo: meio Mueller-Hinton líquido

- 30% de extrato de carne (m/v);
- 1,75% de caseína hidrolisada (m/v);
- 0,15% de amido (m/v);
- 1 L de água destilada; pH final = 7,4.

#### MH sólido: meio Mueller-Hinton sólido

- Idem ao meio Mueller-Hinton líquido;
- 1,5% ágar bacteriológico (m/v); pH final = 7,4.

#### Glicerol 2,5 M

- 40% de glicerol absoluto (v/v);
- água destilada q.s.p.

#### Solução salina

- 0,85% de cloreto de sódio P.A. (m/v);
- 1 L de água destilada.

#### Solução tampão fosfato-Tween 40 (cinética de liberação)

- Tampão fosfato pH = 7,0;
- 10% de Tween 40 (v/v); pH final = 7,0.

## 1. RESUMO

Uma vez que violaceína - um composto com atividade antibiótica, aniparasitária e antitumoral - apresenta baixa solubilidade em água, nanopartículas poliméricas contendo esse composto podem aumentar a sua solubilidade em água e potencializar sua atividade biológica. Logo, o objetivo desse trabalho foi a obtenção e caracterização de nanopartículas poliméricas biocompatíveis de poli-D,L-(lactídeo-co-glicolídeo) 50:50 encapsulando violaceína para posterior avaliação de sua atividade antibacteriana *in vitro* e *in vivo*. As nanopartículas foram preparadas pelo método de nanoprecipitação e caracterizadas em termos físico-químicos (distribuição de tamanho e potencial Zeta), taxas de recuperação de polímero, eficiência de encapsulamento e cinética de liberação *in vitro*. Posteriormente, sua atividade antibacteriana foi testada frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* (incluindo linhagens meticilina-resistentes e resistentes intermediárias a vancomicina) por ensaios de determinação de concentrações mínimas inibitórias, curvas de tempo morte e ensaios de interação com outros antibióticos. Por fim, avaliações da atividade antibacteriana *in vivo* foram realizadas contra uma linhagem de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina em modelo murino imunocomprometido (C3H Nude) e imunocompetente (Balb/C). A metodologia otimizada resultou em nanopartículas com diâmetro entre 116 e 139 nm, bem como carga superficial negativa. A eficiência de encapsulamento variou entre 84 e 90% e a taxa de recuperação do polímero foi de 93%. Pelos ensaios de cinética de liberação *in vitro*, observou-se que a violaceína encapsulada apresenta perfil de liberação sustentada até 160 h de análise nas condições experimentais analisadas. O sistema obtido apresentou atividade antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e atividade não significativa frente à linhagens de enterobactérias Gram-negativas. O sistema

apresentou atividade pelo menos duas vezes maior que a violaceína livre *in vitro* e *in vivo*. Por fim, foi observada uma interação aditiva entre o sistema e antibióticos  $\beta$ -lactâmios e interação sinérgica quando combinado com inibidores de síntese proteica.

## 2. ABSTRACT

Since violacein - an antibiotic, antiviral and antiparasitic compound - exhibits poor solubility in water, polymeric nanoparticles containing this compound could improve its solubility in water and biological activities. Therefore, the aim of this work was the preparation and characterization of biodegradable and biocompatible poly-D,L-(lactide-co-glycolide) 50:50 nanoparticles loading violacein to further evaluation of their antibiotic activity *in vitro* and *in vivo*. The nanoparticles were prepared by nanoprecipitation method and characterized in terms of average diameter and Zeta potential, drug loading and polymer recovery, *in vitro* release kinetics, *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* strains. Nanoparticles with diameter between 116 and 139 nm and negative-charged outer surface were obtained. Drug loading efficiency and polymer recovery were 87% and 93%, respectively. *In vitro* release kinetics assays showed that violacein loaded in these nanoparticles has sustained release profile until 5 days of analysis. The system exhibited antibacterial activity *in vitro* and *in vivo* against *Staphylococcus aureus* methicilin-resistant (MRSA) strains and no significant activity against Gram-negative *Enterobacteriaceae*. Nanoparticles-loaded violacein was at least two times more efficient as antibiotic compound than free violacein both *in vitro* and *in vivo*. Also, this system presented additive interactions when combined with  $\beta$ -lactam antibiotics and strong synergic interactions when combined with protein synthesis inhibitors.



### 3. INTRODUÇÃO

#### 3.1) Isolados Bacterianos Multiresistentes

O constante aparecimento de isolados bacterianos resistentes a múltiplos antibióticos é um assunto amplamente estudado e apontado como um problema mundial de saúde (Apisarnthanarak *et al*, 2007; Buke *et al*, 2007; Strateva *et al*, 2007). Tais microorganismos são frequentemente encontrados em hospitais e causam diversas doenças oportunistas tais como infecções e pneumonias nosocomiais, infecções em ferimentos e queimaduras, infecções relacionados à contaminação de catéteres e septicemia (Demling & Waterhouse, 2007; Lipsky *et al*, 2007). Em todo mundo, entre 5 e 15% dos pacientes internados em hospitais contraem uma ou mais infecções por tais microorganismos nesses ambientes e altos custos com tratamento de tais infecções são relatados todos os anos. Nos Estados Unidos, por exemplo, essas infecções resultam em 80 mil mortes adicionais e os custos adicionais são estimados entre 17 e 29 bilhões de dólares por ano (Jarvis, 2007). Dentre os principais agentes causadores de infecções hospitalares encontram-se isolados de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), espécie que será descrita em detalhes a seguir.

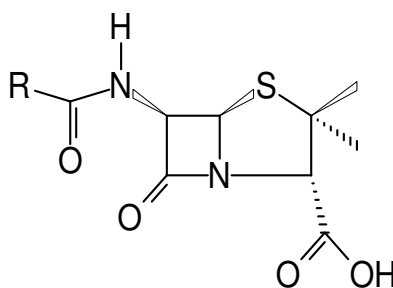
#### 3.2) *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* é uma bactéria comensal de humanos e outros animais. Em humanos, seu habitat primário é o trato respiratório superior, particularmente o epitélio que recobre as fossas nasais (Foster, 2004). Cerca de 20% da população está sempre colonizada por esta bactéria, cerca de 60% são carreadores intermitentes e 20% são não-

carreadores. A taxa de infecção cresce consideravelmente em pacientes internados e em profissionais de saúde, como médicos, enfermeiros e auxiliares de enfermagem (Foster, 2004; Grundmann *et al.*, 2006).

*S. aureus* produz uma gama de diferentes fatores de patogenicidade incluindo proteínas de superfície que promovem a aderência e danos a tecidos, sistemas de escape do sistema imune e uma série de toxinas que causam danos e destroem células e tecidos, atuando como enzimas citolíticas ou superantígenos (Foster, 2004). Esta bactéria é causadora de uma gama de doenças em humanos caracterizadas por infecções localizadas ou disseminadas. Isso faz de *S. aureus* um dos principais agentes causadores de infecções nosocomiais e na comunidade (Salysers & Whitt, 2002).

A introdução da penicilina (Figura 1) na década de 1940 ofereceu uma oportunidade de tratar com sucesso infecções estafilocócicas severas. Tais antibióticos de ação bactericida promovem a inibição da PLP, que promove as ligações cruzadas entre as cadeias de peptídioglicanos da parede celular bacteriana. A inibição de tal enzima promove o afrouxamento da parede celular em síntese e resulta na incapacidade de replicação e na lise da célula bacteriana.



**Figura 1: Estrutura geral das penicilinas. As derivações para diferentes tipos de penicilinas ocorrem por alterações no grupo R.**

Entretanto, no mesmo ano que o primeiro sucesso clínico com penicilina foi relatado, foi descrita também uma enzima produzida por *S. aureus*, a penicilinase (atualmente conhecida por  $\beta$ -lactamase), produto do gene *blaZ*, que ataca o átomo de nitrogênio do ácido-6-aminopenicilânico e inativa o anel  $\beta$ -lactâmico (Lowy, 2003; Hardy *et al.*, 2004). Tal gene é frequentemente localizado em um plasmídio de alto peso molecular que contém genes de resistência a outras classes de antibióticos (Lowy, 2003). Devido a tal problema, na década de 1960, a combinação entre penicilinas e inibidores de  $\beta$ -lactamases (por exemplo, ácido clavulínico) e as penicilinas semi-sintéticas resistentes à ação das  $\beta$ -lactamases (tais como a meticilina e oxacilina) foram desenvolvidas para combater tais infecções. Contudo, um ano após sua introdução, o primeiro caso SARM foi detectado e a primeira falha clínica com meticilina para o tratamento de *S. aureus* foi descrita (Lowy, 2003; Hardy *et al.*, 2004; Grundmann *et al.*, 2006). Atualmente, estima-se que entre 60 e 80% das amostras clínicas de *S. aureus* em todo mundo apresentam resistência a meticilina (WHO, 2008).

Amostras SARM têm evoluído pela aquisição de um elemento genético conhecido como *SCCmec*. Este cassete carrega o gene codificador de uma PLP conhecida como PLP2A, que apresenta afinidade reduzida para antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo penicilinas semi-sintéticas e cefalosporinas (Lowy, 2003; Hardy *et al.*, 2004; Grundmann *et al.*, 2006). O *SCCmec* está inserido em um *locus* específico do cromossomo (*attB<sub>c</sub>*) localizado próximo a origem de replicação. A mobilidade deste elemento é mediada por recombinases específicas codificadas por genes localizadas dentro do elemento, denominadas *ccrA*, *ccrB* ou *ccrC* (Grundmann *et al.*, 2006). Até o momento, baseado no complexo de genes *mec*, *ccr* e genes adicionais, foram descritos cinco tipos de *SCCmec* (*SCCmec* I a V) e alguns variantes (Grundmann *et al.*, 2006).

Amostras SARM geralmente são multiresistentes, ou seja, apresentam resistência a uma série de antibióticos de uso clínico além da metilina e oxacilina, sendo que algumas destas marcas de resistência podem também estar presentes nos elementos SCCmec (Lowy, 2003; Grundmann *et al.*, 2006). Estas amostras, antes associadas predominantemente com infecções nosocomiais, começaram a serem isoladas com frequência de infecções adquiridas na comunidade (Kollef & Micek, 2006; Sabol *et al.*, 2006) e, por isso, receberam a denominação SARM-AC para *S. aureus* metilina resistentes adquiridos na comunidade. Estas amostras apresentam, com maior frequência, SCCmec tipos IV e V.

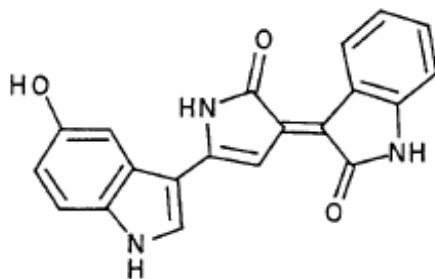
Devido à multiresistência a drogas exibida por amostras SARM, a vancomicina, um antibiótico do grupo dos glicopeptídeos, surgiu como droga de escolha e, muitas vezes, como a última opção no tratamento de infecções causadas por SARM. Contudo, com o passar do tempo, foram isoladas amostras com resistência intermediária a vancomicina (SAIV) e mais recentemente, amostras resistentes a esta droga (SARV) (Tenover *et al.*, 2001; Lowy, 2003; Hardy *et al.*, 2004; Appelbaum, 2006; Grundmann *et al.*, 2006; Tiwari & Sen, 2006; Demling *et al.*, 2007; Sievert *et al.*, 2008). No Brasil, amostras SAIV já foram isoladas (Oliveira *et al.*, 2001). O mecanismo de resistência a vancomicina exibido por amostras SAIV é decorrente de um acúmulo de mutações em linhagens desafiadas constantemente com vancomicina e envolve um espessamento da parede celular (Lowy, 2003; Mwangi *et al.*, 2007). Por outro lado, a resistência exibida por amostras SARV envolve a presença de elementos transferíveis denominados elementos *van*, provenientes de transferência gênica lateral com *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*). Ao todo, 6 fenótipos de resistência à vancomicina estão descritos em *E. faecalis*, estando associados aos elementos *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanE* e *vanG*. De tais fenótipos, apenas *vanA* e *vanB* são de herança plasmidial e, portanto, são passíveis de

transferência gênica lateral entre *E. faecalis* e *S. aureus*. De fato, o fenótipo *vanA* é o predominantemente encontrado em amostras SARV e apresenta maior resistência à vancomicina (concentração mínima inibitória acima de 512  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), além de conter um sistema de dois componentes que promove a ativação do mecanismo de resistência na presença tanto de vancomicina quanto de outros antibióticos glicopeptídicos, tais como a teicoplanina (Hughes, 2003). O *operon vanA* está envolvido na alteração de síntese de um precursor da parede, mais precisamente no peptídeo terminal D-Ala-D-Ala que é substituído por D-Ala-D-Lac. O novo dipeptídeo tem afinidade muito menor a vancomicina, quando comparado a D-Ala-D-Ala (Lowy, 2003).

Existem drogas que podem ser utilizadas no tratamento de infecções causadas por amostras SARM e, particularmente, amostras SAIV e SARV, como quinupristina-dalfopristina e linezolida. No entanto, a aquisição de resistência a linezolida já foi descrita (Lowy, 2003), colocando em risco a eficiência de tais drogas e impondo a necessidade urgente na busca de novos antimicrobianos e novos alvos terapêuticos. Nesse contexto, a busca por novos antibióticos e terapias antimicrobianas para conter tais infecções vêm sendo amplamente pesquisada e desenvolvida.

### 3.3) Violaceína

A violaceína (Figura 2) é um pigmento produzido por algumas espécies bacterianas marinhas e de solo, tais como *Janthinobacterium lividum* (Pantenella *et al.*, 2007), *Pseudoalteromonas luteoviolacea* (Yang *et al.*, 2007) e, especialmente, por *Chromobacterium violaceum* (*C. violaceum*).



**Figura 2: Estrutura química da violaceína (Rettori & Durán, 1998)**

Tal composto apresenta-se como insolúvel em água e bastante solúvel em acetona, etanol, tetrahidrofurano, n-butanol e DMSO (Durán *et al.*, 2007) e apresenta propriedades fotoquímicas, fluorescentes e fotodinâmicas características. No espectro UV-vis, dois picos de absorção característicos são observados: o primeiro deles em 330 nm e uma larga banda de absorção entre 500 e 650 nm, com pico máximo em 575 nm ( $\epsilon_{575} = 2,98 \times 10^{-2} \text{ mL} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Em termos de fluorescência, a excitação da violaceína a 575 nm promove um pico característico de em 675 nm (Durán *et al.*, 2007).

O papel exato da violaceína na fisiologia de *C. violaceum* ainda é questão de estudos. Devido às suas propriedades fotoquímicas, especula-se que tal composto seria uma forma de proteção contra radiação ultravioleta, visto seu pico de absorção em 330 nm (Durán & Menck, 2001). Ainda, aprofundamentos no estudo das propriedades biológicas da violaceína sugerem que tal composto poderia desempenhar papel no sistema antioxidante celular (Konzen *et al.*, 2006) e como defesa contra protozoários não-flagelados (Matz *et al.*, 2004).

Além das suas propriedades fotoquímicas, diversas ações biológicas já foram descritas para a violaceína. Dentre elas, destacam-se as ações antiulcerogênica (Durán *et al.*, 2003), antibiótica e antichagásica (Durán & Menck, 2001), leishmanicida (Leon *et al.*, 2001), antioxidante (Konzen *et al.*, 2006) e indutora de apoptose e linhagens de células tumorais como HL60 (Durán *et al.*, 2005) e HT29 (de Carvalho *et al.*, 2006). Na

linhagem HL60, a apoptose é induzida pela ativação direta do receptor para FNT-1, causando a ativação da caspase 8, transcrição dos genes regulados pelo FN- $\kappa$ B e a ativação da MAP-quinase p38 (Ferreira *et al.*, 2004); Ainda, há evidências da ação multi-alvo da violaceína, ou seja, tal composto promove a ativação de distintos mecanismos citotóxicos de maneira concomitante. Por exemplo, de Carvalho *et al.* (2006) demonstrou que a ação da violaceína em células tumorais da linhagem HT-29 é dependente da produção de espécies reativas de oxigênio, resultado observado também na linhagem leucêmica HL60. Tal mecanismo sugere a participação da via apoptótica mitocondrial no processo de atividade antitumoral. Adicionalmente, Bromberg *et al.* (2005) sugere que a violaceína promove modulação enzimática direta em enzimas fosfatases envolvidas com transdução de sinal em linhagens celulares tumorais. Por fim, tal pigmento apresenta interações farmacológicas combinadas com outros compostos, sendo descrito por Kodach *et al.* (2006) um mecanismo sinérgico de ação antitumoral da violaceína quando combinada com o 5-Fluoroacil em células de câncer colorretal, com mecanismo de inibição de sinalização antiapoptótica dependente de *Akt*.

Em termos de atividade antibiótica, há registros que a violaceína apresenta potente atividade bactericida *in vitro* contra linhagens Gram-positivas, especialmente *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, fraca ação bacteriostática contra *Pseudomonas aeruginosa* e não apresenta atividade significativa contra a maioria das espécies bacterianas Gram-negativas, com exceção à *Xanthomonas axonopodis* (Micas *et al.*, manuscrito em preparação).

Apesar de sua potente atividade antibacteriana frente a isolados de *S. aureus* e *S. epidermidis*, o uso da violaceína é limitado pelas suas propriedades de sensibilidade a pequenas variações de pH (oscilações na casa de 0,5 unidades de basicidade ou acidez promovem perda de sua atividade) e baixa solubilidade em água, sendo necessário o

emprego de solventes tóxicos como DMSO para promover sua completa dissolução e ministração *in vitro* e *in vivo*. Logo, formas hidrossolúveis da violaceína têm sido desenvolvidas com essa finalidade. Dentre elas, o uso de sistemas de liberação sustentada (descritos a seguir) para carrear violaceína torna-se uma alternativa bastante interessante. O primeiro exemplo desse tipo de sistema obtido foi a formação de complexos da violaceína com  $\beta$ -ciclodextrina, um oligossacarídeo cíclico composto por unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosose que pode ser usado para inclusão de compostos de interesse em sua estrutura a fim de promover aumento da hidrossolubilidade da molécula de interesse. Melo *et al.* (2003) demonstraram que o complexo de inclusão  $\beta$ -ciclodextrina/violaceína promove um aumento da solubilidade desse composto em água e potencializa sua atividade antitumoral *in vitro*. Além disso, tal sistema já foi conjugado com nanopartículas de ouro e demonstrou-se tanto mais eficiente como específico para atingir células tumorais (Durán *et al.*, 2005). Logo, há uma crescente perspectiva do uso da violaceína vinculada a tais sistemas para viabilizar o uso de tal composto como agente terapêutico.

#### 3.4) Sistemas de liberação sustentada

Os sistemas de liberação controlada de fármacos ou *drug delivery systems* vêm sendo muito explorados na tecnologia farmacêutica atual, visto que proporcionam vantagens quando comparados com sistemas convencionais de administração: efeito farmacológico otimizado e redução de efeitos colaterais, vista a possibilidade de direcionamento do fármaco ao tecido-alvo, bem como um aumento do tempo de permanência do fármaco na circulação e liberação gradativa deste, mantendo-o em uma faixa terapêutica, além de aumento da solubilidade de compostos hidrofóbicos em



fluidos corpóreos (Ansari *et al.*, 2008; Jain, 2008). Dentre esses sistemas, podem ser citados os lipossomos, complexos de inclusão em  $\beta$ -ciclodextrinas, nanopartículas metálicas, dendrímeros, nanopartículas lipídicas sólidas e nano e micropartículas poliméricas biodegradáveis. Em especial, as nanopartículas poliméricas têm recebido atenção especial dos pesquisadores, vistas as vantagens em termos de estabilidade química nos fluidos biológicos e durante o armazenamento, maior facilidade de penetração em tecidos de difícil acesso, fácil reprodutibilidade dos métodos de obtenção, boa estabilidade físico-química quando comparado a outros modelos de sistemas de liberação sustentada como os lipossomos. Além disso, tais sistemas são comumente obtidos com polímeros biodegradáveis e biocompatíveis (por exemplo, polímeros a base de lactato e glicolato) e, por consequência, estes sistemas apresentam baixa toxicidade para sistemas biológicos (Nair & Laurencin, 2007).

### 3.5) Nanopartículas Poliméricas: Características e Obtenção

O termo nanopartículas refere-se a dois tipos de estruturas distintas com tamanho inferior a 1  $\mu\text{m}$ : as nanoesferas, nas quais o conteúdo a ser encapsulado (ativo) encontra-se espalhado de maneira homogênea dentro da matriz polimérica formando um sistema monolítico, e as nanocápsulas, nas quais o conteúdo interno encontra-se concentrado em um núcleo (sólido ou líquido) e a matriz polimérica o recobre, isolando-o do meio externo (Schaffazick *et al.*, 2003). Essas partículas podem ser obtidas através de diferentes métodos, dependendo da finalidade do sistema final; no entanto todos seguem o princípio básico de auto-organização do sistema sob determinadas condições (temperatura, presença de tensoativos, uso de solventes e co-solventes). Por exemplo, os métodos emulsão simples (ou óleo-água) visam o encapsulamento de compostos

hidrofóbicos solúveis em compostos imiscíveis em água (tais como clorofórmio, acetato de etila e diclorometano); neste método, usa-se uma fase orgânica contendo o polímero formador da matriz dissolvido juntamente com o composto ativo de interesse e, posteriormente, essa fase é vertida ou gotejada a uma solução contendo tensoativos apropriados sob agitação constante para quebra da emulsão. À medida que a emulsão é quebrada, as nano ou micropartículas são formadas. Em outro exemplo, o método de emulsão inversa (água-óleo), o polímero e o composto de interesse são dissolvidos em água e vertidos em uma fase orgânica contendo solventes fortemente apolares (hexano ou éter de petróleo, por exemplo), necessitando-se novamente a quebra da emulsão para formação das partículas de interesse. Finalmente, um dos métodos mais usados na literatura para encapsulamento de fármacos hidrofóbicos é a nanoprecipitação, em que o polímero é dissolvido em um solvente orgânico volátil e solúvel em água e, posteriormente, esta solução é adicionada a uma fase aquosa com tensoativos apropriados. As grandes vantagens deste método são que não é necessária a evaporação do solvente para formação das nanopartículas, o método apresenta fácil escalonamento e resulta em uma distribuição homogênea de tamanho de ordem nanométrica (Fessi *et al.*, 1987).

Comumente, as nanopartículas poliméricas são construídas utilizando-se como matriz polímeros biodegradáveis e biocompatíveis que, por definição, são materiais passíveis de serem degradados a produtos inócuos por vias metabólicas animais e, especialmente, humanas (Prabaharan, 2008). Dentre esses materiais comumente empregados na obtenção de nanopartículas poliméricas, podem ser citados a quitosana, alginato, estruturas baseadas em lactato (PLA), glicolato (PLG) e seus co-polímeros (PLGA), polímeros de caprolactona (PCL) e co-polímeros de lactato e caprolactona (PLCL). Tais materiais apresentam um longo histórico de uso médico e farmacêutico e,

atualmente, têm o aval do órgão americano FDA (*Food and Drug Administration*) para usos terapêuticos em humanos (FDA, 2008). É importante ressaltar que tais cuidados são cruciais na construção de sistemas de liberação sustentada, visto que a matriz polimérica não funciona somente como um veículo e sim como parte do agente terapêutico, visto que há uma completa alteração das propriedades físico-químicas e farmacológicas do composto de interesse quando há a conjugação com o sistema de liberação sustentada. Especificamente, o polímero poli-lactideo-co-glicolideo (PLGA) apresenta aprovação do FDA e ANVISA, bem como possui um amplo histórico de uso na literatura e indústria farmacêutica para aplicações em dispositivos médicos, tais como suturas e implantes biodegradáveis (FDA, 2008).

Diversos usos farmacêuticos e biotecnológicos têm sido propostos para as nanopartículas poliméricas, tais como encapsulamento de compostos cosmeceuticos, antibióticos (Durán *et al.*, 2008), antitumorais (Marcato & Durán, 2007), fototerapêuticos, imunossuppressores, proteínas, genes e ARNs de interferência, além de formulações contendo contrastes para diagnósticos (Lee *et al.*, 2008; Jain, 2008-a). Desta forma, as nanopartículas poliméricas apresentam grande potencial farmacêutico e biotecnológico na viabilização e potencialização de efeitos farmacológicos tanto de compostos já conhecidos quanto de fármacos emergentes, bem como redução de seus efeitos adversos.

#### **4. OBJETIVO GERAL**

Uso da violaceína livre e veiculada por nanocarreadores como agente antibacteriano.

#### **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Preparação de nanopartículas poliméricas biodegradáveis a base de PLGA 50:50 encapsulando o agente ativo violaceína;
- b) Caracterização físico-química das nanopartículas;
- c) Caracterização do perfil de cinética de liberação *in vitro* do sistema obtido;
- d) Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* da violaceína encapsulada frente a diferentes linhagens bacterianas;
- e) Avaliação de possíveis mecanismos de ação combinada entre violaceína livre/encapsulada com outros antibióticos;
- f) Desenvolvimento de modelos murinos de infecção sistêmica por *Staphylococcus aureus*.
- g) Avaliação da atividade antibacteriana *in vivo* da violaceína livre e encapsulada frente à linhagem de *S. aureus* Rib1, uma linhagem resistente a metilciclina.

## 6. JUSTIFICATIVA

Diversos estudos comprovam o amplo espectro de atividade biológica da violaceína, incluindo sua atividade antibacteriana e antitumoral. Em se tratando dessas atividades, nosso laboratório previamente concluiu estudos demonstrando potente atividade da violaceína livre frente a cepas e isolados de *S. aureus* e *S. epidermidis*, além do importante fato de que fenótipos de resistência à violaceína não foram detectados. Contudo, o uso desse composto é limitado pela sua baixa solubilidade em água e fluídos corpóreos, bem como sua sensibilidade a pH e elevada toxicidade. A proposta desse trabalho é criar um sistema de liberação sustentada que facilite a solubilização desse composto bem como promova proteção contra variações de pH e redução da toxicidade para o organismo. Tais fatos são bem descritos na literatura de sistemas de liberação sustentada e são apontados como vantagens de tais sistemas frente às terapias antimicrobianas atuais. Ainda, o sistema aqui proposto pode incrementar outras atividades da violaceína livre, tais como atividade antitumoral e antiparasitária.

## 7. METODOLOGIA

### 7.1) Extração e purificação da violaceína

Tal etapa foi realizada em parceria com o Prof. Dr. Nelson Durán, do Laboratório de Química Biológica (Instituto de Química – Unicamp). A violaceína utilizada neste trabalho foi extraída e purificada da linhagem CCT 3468 de *Chromobacterium violaceum*, como descrito em Rettori & Durán (1998). Inicialmente, culturas líquidas de *C. violaceum* foram repicadas em 1 L de meio CN suplementado

com 0,5% de glicose (m/v) e 0,032% do aminoácido L-triptofano (m/v) e crescidas durante 18 h à 30°C e agitação de 120 rpm. Posteriormente, o caldo foi transferido para garrafas *Roux* recobertas com algodão e tais garrafas foram incubadas durante 3 dias em biorreator de gavetas a 30°C (Rettori & Durán, 1998) com tensão constante de oxigênio para indução da síntese da violaceína pelas culturas. Após esse período, a massa bruta foi extraída do algodão usando-se etanol comercial 95% e rotaevaporada até a extração completa do solvente orgânico. A massa foi desidratada por liofilização à -20°C para iniciar-se o processo de purificação.

A etapa de purificação foi feita em extrator tipo *Soxhlet* em três etapas distintas: inicialmente, utilizou-se clorofórmio para romper e eliminar componentes de membrana e parede celular. Em seguida, usou-se éter etílico para eliminação de outros pigmentos e antibióticos produzidos por *C. violaceum* (principalmente intermediários da síntese da violaceína, tais como a desoxiviolaceína). Por fim, a extração da violaceína se fez com etanol (P.A) e tal fração foi rotaevaporada e ressuspensa em metanol. A fração metanólica foi submetida ao processo de microextração em fase líquida, que consiste na retirada do metanol que solvata o composto de interesse pela adição de água (que solubiliza o metanol, porém não a violaceína). O resultado é a cristalização e precipitação da violaceína.

Para assegurar a pureza da amostra, um processo de filtração em coluna de sílica (porosidade 100-200 *mesh*) foi realizado na violaceína cristalizada, usando-se como fase móvel etanol (P.A). Por fim, a violaceína pura foi rotaevaporada e liofilizada para posteriores análises e procedimentos experimentais.

Para averiguar a pureza da amostra, análises de RMN e espectroscopia em UV-Vis foram realizadas. A pureza dos lotes foi determinada como acima de 98%.

## 7.2) Preparação das nanopartículas

As partículas foram preparadas pelo método de nanoprecipitação, como descrito por Fessi *et al.* (1987). Inicialmente, o polímero biodegradável PLGA 50:50 e o composto ativo violaceína foram completamente dissolvidos em acetona nas proporções de 0,4% e 0,05%, respectivamente. Essa fase orgânica foi continuamente vertida a uma fase aquosa contendo o tensoativo polimérico Pluronic F68 e o estabilizante PVA nas proporções de 0,06% de cada um. A mistura foi mecanicamente agitada por 5 min e posteriormente rotaevaporada para extração do solvente orgânico e redução do volume da suspensão. A caracterização físico-química foi realizada para diferentes volumes finais de suspensão, bem como para a formulação liofilizada. Ainda, um planejamento foi adotado para verificar a influência das concentrações de tensoativos sobre os parâmetros físico-químicos, estabilidade, eficiência de encapsulamento e rendimento da preparação. Para tal, foram realizadas preparações variando-se a quantidade dos dois tensoativos da preparação e, por fim, os parâmetros descritos acima foram avaliados.

## 7.3) Caracterização das nanopartículas

### 7.3.a) Distribuição de tamanho e potencial Zeta

A análise de distribuição de tamanho e potencial Zeta foi realizada pelo método de espalhamento de luz dinâmico (EDL). As amostras foram serialmente diluídas em água deionizada e analisadas pelo aparelho *Malvern ZetaSizer Nano Series* (Malvern, Reino Unido). Os sistemas obtidos em suspensão apresentaram-se monodispersos (índices de polidispersidade < 0,08).

### 7.3.b) Eficiência de encapsulamento

Inicialmente, as nanopartículas em suspensão e as nanopartículas precipitadas por centrifugação foram dissolvidas em etanol absoluto para solubilização do total de violaceína presente na preparação. Posteriormente, esse conteúdo foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 min para precipitação do polímero e tensoativos da matriz. Por fim, o sobrenadante teve sua concentração de violaceína determinada por análise em espectroscopia em UV-Vis a 575 nm (coeficiente de extinção molar da violaceína a 575 nm em etanol –  $\epsilon_{575\text{nm}(\text{EtOH})} = 2,98 \times 10^{-2} \text{ mL} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

### 7.3.c) Rendimento da preparação

Para obter-se o rendimento bruto da preparação, as nanopartículas foram precipitadas e lavadas duas vezes com água deionizada por centrifugação a 10.000 rpm. Posteriormente, o precipitado foi congelado em nitrogênio líquido e liofilizado durante 24 h. A massa total foi recuperada, quantificada e o rendimento da preparação foi calculado pela expressão: (Massa de total recuperada)/(Massa de polímero utilizado na preparação – Massa de violaceína recuperada na formulação).

### 7.3.d) Perfil de cinética de liberação *in vitro*

A avaliação do perfil de cinética de liberação *in vitro* foi realizada em solução de tampão fosfato-Tween 40. Tal sistema permite a análise da solubilização e liberação de compostos hidrofóbicos para a solução de análise. Inicialmente, uma quantidade de 5 mL da suspensão contendo as partículas foi dissolvida em 20 mL da solução de análise.



Posteriormente, o sistema foi incubado a 37°C e agitação constante de 200 rpm. Em intervalos de tempo, uma alíquota da solução foi coletada, centrifugada e seu sobrenadante foi submetido à análise de espectroscopia em UV-vis a 575 nm para determinação da quantidade de violaceína solubilizada ou liberada naquele intervalo de tempo. Para evitar a saturação da solução de análise, ao fim de cada coleta adicionou-se um volume extra de 1 a 2 mL de nova solução tampão fosfato-Tween 40. Como controle de liberação, uma quantidade de violaceína livre equivalente ao total presente nos 5 mL de formulação teve seu perfil de solubilização analisado sobre as mesmas condições descritas acima. Os resultados foram convertidos em porcentagem cumulativa de fármaco liberado por intervalo de tempo.

#### 7.4) Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro*

##### 7.4.a) Linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas utilizadas nesse trabalho estão descritas na Tabela 1. Todas as linhagens foram crioconservadas a -80°C em estoques contendo glicerol a 2,5 M (40% v/v).

**Tabela 1: Linhagens e isolados bacterianos utilizados neste trabalho.**

<b>Linhagem ou isolado</b>	<b>Procedência</b>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> .Ana Lúcia da Costa Darini
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium LT2	Prof. Dr. Roy Curtiss III
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 SASM	LGBMOL
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 SASM	Prof. Dr. Nelson Durán
<i>Staphylococcus aureus</i> N315 SARM	Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Elsa Masae Mamizuka
<i>Staphylococcus aureus</i> Rib1 SARM	Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
<i>Staphylococcus aureus</i> BEC9393 SARM	Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
<i>Staphylococcus aureus</i> HV 27Hetero SAIIV SARM	Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Elsa Masae Mamizuka
<i>Staphylococcus aureus</i> HV 138 Hetero SAIIV SARM	Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> .Elsa Masae Mamizuka
<i>Staphylococcus aureus</i> VISA V15 SARM	Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Elsa Masae Mamizuka
<i>Staphylococcus aureus</i> VISA V7 SARM	Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Elsa Masae Mamizuka
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 SESM	Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Ana Lúcia da Costa Darini
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29213	Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Ana Lúcia da Costa Darini

#### 7.4.b) Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

A determinação da concentração mínima inibitória foi realizada por ensaios de microdiluição em caldo MH em uma ampla faixa de concentração de tratamentos, como sugerido pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003). Inicialmente, as bactérias foram cultivadas em meio MH sólido a 37°C para a obtenção de colônias isoladas. Posteriormente, as colônias foram solubilizadas em solução salina 0,85% (m/v) e ajustadas ao índice 0.5 na escala de Mac Farland ( $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônia – ufc.mL<sup>-1</sup>). Tal solução foi diluída em caldo MH e distribuída em placa de 96 cavidades à densidade de  $10^5$  ufc/cavidade. Cada cavidade foi tratada com diferentes concentrações da formulação de nanopartículas contendo violaceína. As placas foram incubadas durante 18 horas e a densidade óptica das culturas foi determinada a 595 nm,

após esse período. Como corroboração, os conteúdos de cada cavidade foram diluídos seriadamente em solução salina e plaqueados em meio MH sólido para posterior contagem das unidades formadoras de colônia. Como controle, foi usada uma formulação de nanopartículas preparada sem adição de violaceína.

#### 7.4.c) Experimentos de tempo-morte

Os experimentos de tempo-morte foram conduzidos para as linhagens ATCC 29213, BEC 9393 e Rib 1 de *S. aureus*, visto que a ATCC 29213 é uma cepa padrão para testes de compostos antibióticos (CLSI, 2003) e que as cepas BEC 9393 e Rib 1 são isolados SARM de importância clínica. Para tal, as linhagens foram semeadas em meio MH sólido e crescidas por 18 h a 37°C. Posteriormente, colônias isoladas foram diluídas em solução salina 0,85% (m/v) e ajustadas para o índice 0.5 na escala de MacFarland (correspondente a  $1,5 \times 10^8$  ufc.mL<sup>-1</sup>). Desta solução, 10 µL foram transferidos para 10 mL de meio MH caldo, atingindo-se uma densidade de  $10^5$  ufc.mL<sup>-1</sup>. Tais culturas foram tratadas com duas concentrações de violaceína livre e encapsulada e crescidas a 37°C sob agitação de 200 rpm. Em intervalos de tempo, uma alíquota de 100 µL de cada cultura foi separada, seriadamente diluída e plaqueada em meio MH sólido pelo método da gota, como descrito por Barbosa *et al.* (1993). As placas foram crescidas durante 18 h a 37°C e o total de unidades formadoras de colônias recuperadas foram contadas para as diluições realizadas. Para confirmar a linearidade dos dados, a concordância entre os valores das diluições foi adicionalmente determinada, sendo que os resultados a seguir demonstrados apresentaram uma alta correlação linear ( $r^2 > 0.97$ ).

#### 7.4.d) Atividade combinada da violaceína livre e encapsulada com outros antibióticos

Para avaliar possíveis ações combinadas da violaceína livre e encapsulada com outros antibióticos, foi utilizada a metodologia de ensaio de determinação da concentração mínima inibitória em duplo gradiente, descrita por Chin *et al.* (1997). Inicialmente, as concentrações mínimas inibitórias de todos os antibióticos testados foram determinadas separadamente, de acordo com os procedimentos descritos na seção 5.2.c. Posteriormente, foram realizados os ensaios de interação construindo-se um gradiente de violaceína livre ou encapsulada e, em seguida, um segundo gradiente (localizado perpendicularmente ao primeiro) do antibiótico a ser testado em placas de 96 cavidades. Os resultados foram interpretados como concentração mínima inibitória da combinação, ou seja, a concentração mínima de violaceína livre ou encapsulada que, quando combinada com uma concentração mínima do segundo antibiótico, promove inibição do crescimento bacteriano. Por fim, o índice de concentração letal fracionada (CLF) foi calculado de acordo com as expressões:

$$CLF = CMI(Vc)/CMI(Vs) + CMI(Ac)/CMI(As); e$$

$$CLF = CMI(VEc)/CMI(VEs) + CMI(Ac)/CMI(As),$$

onde CMI(Vc) é a concentração mínima inibitória da violaceína livre usada em combinação com o segundo antibiótico, CMI(Vs) é a concentração a inibitória da violaceína livre usada sozinha, CMI(Ac) é a concentração mínima inibitória do segundo antibiótico usado em combinação com a forma livre ou encapsulada da violaceína, CMI(As) é a concentração mínima inibitória do segundo antibiótico usado sozinho, CMI(VEc) é a concentração mínima inibitória da violaceína encapsulada usada em

combinação com o segundo antibiótico e CMI(VEs) é a concentração a inibitória da violaceína encapsulada usada sozinha. Os valores de CLF foram interpretados da seguinte forma:  $CLF \leq 0.5$  = interação sinérgica;  $0.5 < CLF \leq 1.0$  = interação aditiva;  $1.0 < CLF \leq 4.0$  = indiferente;  $CLF > 4.0$  = interação antagônica (Chin *et al.*, 1997). Os antibióticos usados nesse teste foram: ampicilina, oxacilina, estreptomicina, cloranfenicol e rifampicina.

#### 7.5) Avaliação da atividade antimicrobiana *in vivo*

##### 7.5.a) Estabelecimento do modelo de infecção por *S. aureus*

Modelos murinos de infecção sistêmica por *S. aureus* para avaliação da atividade antibacteriana são escassos na literatura, sendo o modelo murino CF-1 o mais utilizado (Kokai-Kun *et al.*, 2007). No entanto, não dispomos desta linhagem em nosso meio. Para os testes *in vivo* de atividade antibacteriana da violaceína livre e encapsulada, essa parte do trabalho visou testar e obter modelos de infecção sistêmica por *S. aureus* em diferentes linhagens de camundongos.

Analisamos a capacidade de diferentes linhagens e isolados clínicos de *S. aureus* em estabelecer infecção sistêmica em modelo murino imunodeprimido C3H Nude. Os animais foram obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB-Unicamp) e usados com idade entre 6-8 semanas. Todos os procedimentos experimentais descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (CEEA-Unicamp), com número de protocolo 1619-1 (Setembro, 2008).

Inicialmente, os animais foram inoculados intraperitonealmente com  $10^8$  ufc de diferentes linhagens de *S. aureus* (ATCC 29213, N315, BEC9393 e Rib1). Posteriormente, coletas de sangue e órgãos foram realizadas 7 dias após a infecção. As amostras foram serialmente diluídas em solução salina 0,85% (m/v) e plaqueadas em meio AMS pelo método de gotejamento, como descrito por Barbosa *et al.* (1998). Tais culturas foram crescidas por 24 h a 37°C e a quantidade total de ufc foi determinada.

Após os resultados obtidos (ver seção de Resultados e Discussão), pôde-se concluir que a linhagem Rib 1 apresentou maior sucesso na taxa infecção no modelo citado. Dessa forma, usou-se esta linhagem como padrão para infecção sistêmica. Adicionalmente, foi testada a capacidade desta linhagem em infectar modelos imunocompetentes, sendo escolhida a linhagem de camundongos Balb/C Uni (obtida do Centro de Bioterismo da Unicamp) como modelo experimental. Tais procedimentos foram aprovados pelo CEEA-Unicamp, com número de protocolo 1730-1 (Dezembro, 2008).

Ambas as linhagens de camundongos foram infectadas com  $10^8$  ufc da linhagem Rib 1 e, periodicamente, coletas de sangue foram realizadas para acompanhar o curso da infecção. As amostras de sangue foram serialmente diluídas em solução salina e plaqueadas em meio AMS pelo método de gotejamento, como descrito acima. Tais culturas foram crescidas por 24 h a 37°C e a quantidade total de ufc foi contada.

Como comprovação dos dados, 30 colônias dessas culturas foram escolhidas aleatoriamente e submetidas à identificação bioquímica completa automatizada pelo aparelho bioMérieux VITEK 2 – sistema de identificação para bactérias Gram-positivas (Marcy l'Etoile, France), como descrito em Funke & Funke-Kissling (2005). Para controle rotineiro, colônias aleatoriamente escolhidas foram periodicamente submetidas à reavaliação da CMI para oxacilina e teste de coagulase.

#### 7.5.b) Experimentos de atividade antimicrobiana in vivo da violaceína livre e encapsulada

Após os resultados de estabelecimento do modelo de infecção sistêmica por *S. aureus*, a linhagem Rib1 mostrou-se um modelo de infecção mais interessante para avaliação da atividade antimicrobiana da violaceína livre e vinculada ao sistema de liberação sustentada aqui obtido por dois motivos principais: primeiro, presença de persistente e mais elevado título de ufc em curtos intervalos de tempo em comparação às outras linhagens testadas; segundo, devido à sua importância clínica, visto o seu fenótipo SARM.

Dessa forma, inicialmente os animais C3H Nude foram infectados intraperitonalmente, como descrito na seção anterior. Quatro horas após a infecção, diferentes doses de violaceína livre e encapsulada foram ministradas intraperitonalmente nos camundongos e, posteriormente, uma segunda dose foi ministrada 22 h após a infecção inicial. Depois de um período de 24 h após a segunda dose de fármaco (50 h pós-infecção), os animais foram submetidos à coleta de sangue e sacrificados para coleta de baço e fígado. Os órgãos foram mecanicamente homogeneizados e diluídos serialmente para plaqueamento em meio AMS. Da mesma forma, o sangue foi serialmente diluído e plaqueado segundo o procedimento apresentado na seção 6.5.a.

Por fim, procedimentos similares foram realizados para acompanhar a atividade antimicrobiana *in vivo* da violaceína livre e encapsulada em modelo Balb/C Uni com algumas adaptações. Os animais foram infectados intraperitonalmente como descrito anteriormente e a infecção foi acompanhada durante 5 dias. Após esse período, foram realizados os devidos tratamentos. No caso desse modelo, foram avaliadas as respostas

obtidas com uma ou duas doses de igual quantidade de violaceína livre ou encapsulada: a primeira dose foi aplicada 5 dias após a infecção e, nos casos da segunda dose, o tratamento foi realizado após um intervalo de 18 h da primeira aplicação. Passados 7 dias pós-infecção, recolheu-se sangue dos animais tratados com uma e duas doses dos antimicrobianos aqui analisados. Dados os resultados desses experimentos, verificou-se que a análise comparativa entre as atividades da violaceína livre e encapsulada só seria possível com a aplicação de duas doses de cada uma das formulações uma vez que, no caso da violaceína livre, a aplicação de uma única dose resultou em comportamento randômico em termos de recuperação de ufc. Portanto, a coleta de órgãos foi realizada somente para os animais tratados com duas doses após 7 dias de infecção. A coleta e processamento dos órgãos foram realizados como descrito anteriormente para o modelo C3H Nude

#### 7.6) Análise estatística

Os experimentos de cinética de liberação *in vitro* foram conduzidos com 4 replicatas e repetidos 3 vezes. Os experimentos de determinação da CMI foram realizados com 8 replicatas e repetidos 3 vezes e as curvas de tempo-morte foram conduzidos com 4 replicatas e repetidas 3 vezes. As avaliações *in vivo* foram realizados com 4 animais por grupo e repetidos 3 vezes. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo teste ANOVA e probabilidades menores que 0,05 foram consideradas significativas.



## 8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 8.1) Preparação e caracterização das nanopartículas

Inicialmente, os parâmetros físico-químicos e taxas de recuperação de polímero e violaceína de formulações preparadas com diferentes concentrações de tensoativos foram avaliados. Tais resultados estão descritos na Tabela 2.

Como pode ser observado, as partículas apresentaram distribuição de tamanho de ordem nanométrica e carga superficial externa (potencial Zeta) fortemente negativa. Tais valores de carga superficial condizem com as predições da literatura sobre formulações de nanopartículas a base de PLGA (Ganea *et al.*, 2008), uma vez que tal polímero apresenta grupamentos carbóxi-terminais ionizáveis em sua composição. Esses grupamentos, em solução aquosa, sofrem ionização e geram grupamentos carbóxi-terminais negativos que explicam a carga superficial negativa observada. Observa-se que os parâmetros físico-químicos e taxas de recuperação de polímero e violaceína são fortemente influenciados por diferentes concentrações de tensoativos e estabilizantes na preparação. Ainda, as suspensões obtidas apresentam melhores resultados com a combinação Pluronic-PVA como fase tensoativa-estabilizante, com concentração ótima de 0.06% de cada um desses componentes. De fato, a literatura descreve a eficiente capacidade estabilizante do PVA em preparações de nanopartículas quando comparado a outros tensoativos/estabilizantes como SDS (Ganea *et al.*, 2008; Westedt *et al.*, 2007). Ainda, a concentração de 0.06% de cada um dos componentes tensoativos e estabilizantes da fase aquosa nos remete à uma proporção final de 1,2% de cada um desses componentes após a redução de volume da suspensão por rotaevaporação. Ganea *et al.* (2008) descreve que os parâmetros ótimos de estabilidade

físio-química de suspensão são obtidos com proporções de 1 a 2% de tensoativos na suspensão final. Portanto, o sistema obtido com 0,06% de cada um dos tensoativos/estabilizantes foi escolhido para futuras avaliações de estabilidade e atividade antimicrobiana.

**Tabela 2: Planejamento adotado para otimização da preparação de nanopartículas contendo violaceína.**

<b>Preparação</b>	<b>Diâmetro médio (nm)</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>Eficiência de encapsulamento (%)</b>	<b>Recuperação de polímero (%)</b>
NP-Pluronic 0.12%	120	-32,5	-	65%
NP-Pluronic 0.06%	115	-33,6	-	55%
NP-Pluronic 0.06% - PVA 0.06%	116	-26,5	-	96%
NP-Pluronic 0.06% - PVA 0.03%	128	-29,7	-	87%
NP-Pluronic 0.12% - violaceína	140	-20,7	58%	59%
NP-Pluronic 0.06% - violaceína	138	-18,7	60%	48%
NP-Pluronic 0.06% - PVA 0.06% - violaceína	131	-11,3	92%	93%
NP-Pluronic 0.06% - PVA 0.03% - violaceína	135	-15,8	85%	82%

Um segundo teste foi realizado com tal sistema para verificar a influência do processo de rotaevaporação e extração completa de água por liofilização nos parâmetros físico-químicos do sistema descrito. Os resultados estão mostrados na Tabela 3.

**Tabela 3: Influência do processo de redução do volume de suspensão nos parâmetros físico-químicos da preparação das nanopartículas (Nota: ND = valor não determinado).**

	Branco		Nanopartículas com violaceína	
Porcentagem de água na suspensão	Diâmetro médio (nm)	Potencial Zeta (mV)	Diâmetro médio (nm)	Potencial Zeta (mV)
100	117 ± 12,8	-28,4 ± 1,4	128 ± 14,6	-15,9 ± 0,7
50	117 ± 14,5	-28,5 ± 2,1	129 ± 15,8	-13,6 ± 1,3
25	117 ± 14,2	-27,8 ± 0,8	129 ± 13,7	-12,4 ± 0,8
10	117 ± 13,8	-26,9 ± 1,1	130 ± 12,1	-12,5 ± 1,3
5	118 ± 15,1	-26,5 ± 0,7	131 ± 13,1	-11,3 ± 1,7
Suspensão liofilizada	500 – 1.000	ND*	476 – 1.110	ND*

Ambos os parâmetros de distribuição de tamanho e carga superficial foram levemente afetados pela redução do volume da suspensão. No caso da distribuição de tamanho, o efeito foi mais pronunciado quando foi realizado um processo de liofilização pós-redução de volume. Tal efeito é bem descrito na literatura e decorre do aumento da tensão interfacial entre as nanopartículas à medida que a água é completamente retirada da suspensão (Mosqueira *et al.*, 2000). Como consequência, ocorre agregação de partículas vicinais e consequente aumento do tamanho médio destas após o processo de liofilização. Tal efeito pode ser corrigido com o uso de crioprotetores em concentrações entre 2 e 5% (m/v), que são compostos que promovem o aumento de viscosidade da solução de análise (exemplos: sacarose, manitol e tensoativos poliméricos de alto peso molecular) e criam uma matriz amorfa ao redor das nanopartículas (Jeong *et al.*, 2005; Abdelwahed *et al.*, 2006). Essa matriz impede a aproximação e agregação das nanopartículas e previne seu aumento de tamanho durante o processo de liofilização. Uma alternativa para escalonamento da preparação dessas formulações é o uso do método de secagem por *spray* (*spray-drying*), que apresenta a vantagem de não-necessidade da redução de volume por rotaevaporação, bem como a obtenção da

formulação em formato de pó (interessante para fins farmacêuticos, uma vez que aumenta a estabilidade da formulação a longo prazo bem como reduz os riscos de contaminação) com distribuição de tamanho nanométrica e homogênea (Takashima *et al.*, 2007). Apesar do uso de suspensões para armazenagem de nanopartículas representa um tópico de discussão na literatura pela questão da esterilidade da formulação, a manutenção de compostos com ampla atividade antibiótica e antifúngica (como a violaceína) torna-se facilitada, visto que o próprio composto ativo funciona como agente esterilizante da suspensão.

No presente caso, dentre as formas de estocagem testadas, a manutenção dos sistemas em suspensão com redução de volume a 5% do volume inicial de formulação foi o melhor modo de estocagem e manipulação. Ainda, tal suspensão apresentou boa estabilidade físico-química e manutenção de sua atividade biológica mesmo quando estocada até 5 meses a 4°C.

Em termos de potencial Zeta, a variação mais significativa observada foi que a adição de violaceína à preparação promove uma redução da carga superficial das partículas. Tal efeito possivelmente deve-se a adsorção de parte da violaceína à superfície externa das partículas. Essas observações são corroboradas pelos desvios observados nos cálculos de eficiência de encapsulamento quando se compara a carga de violaceína dosada na suspensão de nanopartículas com a carga obtida na dosagem das nanopartículas precipitadas por centrifugação. As demais variações decorrentes da redução do volume da suspensão podem ser explicadas pelo aumento da concentração dos tensoativos na suspensão final à medida que o volume desta foi reduzido.

## 8.2) Perfil de cinética de liberação *in vitro*

A caracterização da cinética de liberação do sistema de liberação sustentada obtido foi realizada em experimentos com 4 replicatas, bem como variando-se as quantidades da formulação de violaceína encapsulada adicionada à solução de análise. A curva que resume os perfis de cinética de liberação do sistema de liberação sustentada em comparação ao perfil de difusão da violaceína livre está descrita na Figura 3.

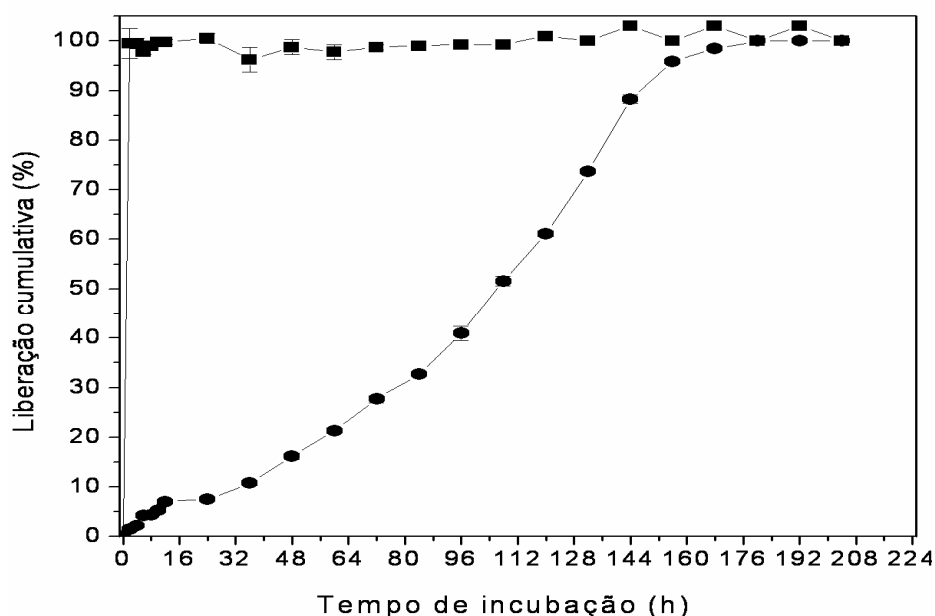


Figura 3: Perfil de cinética de liberação *in vitro* da violaceína livre (■) e encapsulada (●).

No caso da violaceína livre, observa-se um perfil de dissolução completo na solução de análise após 8 h de incubação, enquanto que no caso da violaceína encapsulada observa-se uma dissolução inicial de aproximadamente 8% do seu conteúdo total de violaceína até 8 h de incubação, seguida por uma liberação gradativa deste composto até 176 h de análise. Esse comportamento pode ser explicado em duas partes: em um primeiro momento, a violaceína não-encapsulada presente na suspensão é dissolvida rapidamente na solução de análise e, em seguida, inicia-se a difusão do

conteúdo encapsulado para o meio externo. Tal resultado corrobora as observações realizadas nos ensaios de eficiência de encapsulamento, que aponta uma diferença entre 6-10% do total de violaceína presente na suspensão em comparação ao total de violaceína recuperada das nanopartículas lavadas e liofilizadas. Por fim, tal ensaio ainda comprova que a maior parte do fármaco usado na preparação foi encapsulado com sucesso e apresenta liberação sustentada em fase aquosa, o que representa uma possibilidade de controle da concentração liberada de violaceína em sistemas biológicos. Essa propriedade é amplamente descrita como uma vantagem dos sistemas de liberação sustentada em relação à terapia convencional, visto que doses controladas e com maior biodisponibilidade do composto de interesse podem ser ministradas *in vivo*, facilitando dessa forma a manutenção da sua concentração terapêutica em fluidos corpóreos (Jain, 2008-b). Ainda, tal liberação sustentada pode ser moldada para aumentar a eficiência de terapias de longa duração tais como tratamento de infecções persistentes.

### 8.3) Ensaios de atividade antimicrobiana *in vitro*

#### 8.3.a) Determinação das CMI

Após a seleção do melhor sistema obtido, avaliou-se a atividade antimicrobiana da violaceína encapsulada frente a diferentes linhagens bacterianas e comparou-se seu efeito antimicrobiano com o da violaceína livre. Inicialmente, um ensaio de determinação de CMI foi realizado. Os resultados estão descritos na Tabela 4.

**Tabela 4: Determinação das CMI para diferentes linhagens bacterianas.**

<b>Linhagem ou isolado</b>	<b>Violaceína livre</b>	<b>Violaceína encapsulada</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> N315	15 µM	5,8 µM
<i>Staphylococcus aureus</i> Rib1	15 µM	5,8 µM
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	15 µM	5,8 µM
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	30 µM	12 µM
<i>Staphylococcus aureus</i> BEC 9393	15 µM	5,8 µM
<i>Staphylococcus aureus</i> HV 27 Hetero VISA MRSA	60 µM	30 µM
<i>Staphylococcus aureus</i> HV 138 Hetero VISA MRSA	60 µM	30 µM
<i>Staphylococcus aureus</i> VISA V15 MRSA	60 µM	30 µM
<i>Staphylococcus aureus</i> VISA V7 MRSA	60 µM	30 µM
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 MSSE	15 µM	7,5 µM
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Insensível até 200 µM	Insensível até 200 µM
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Insensível até 200 µM	Insensível até 200 µM
<i>Salmonella enterica</i> LT2	Insensível até 200 µM	Insensível até 200 µM

Por este ensaio, demonstra-se que a violaceína livre e encapsulada demonstra atividade antibacteriana principalmente às linhagens de *S. aureus* e *S. epidermidis*, enquanto que as linhagens Gram-negativas testadas não apresentam sensibilidade a violaceína, tanto na forma livre quanto encapsulada. Tal resultado foi previamente descrito por nosso grupo, uma vez que se demonstrou que linhagens bacterianas Gram-negativas não apresentam sensibilidade a violaceína livre, mesmo quando esta é usada

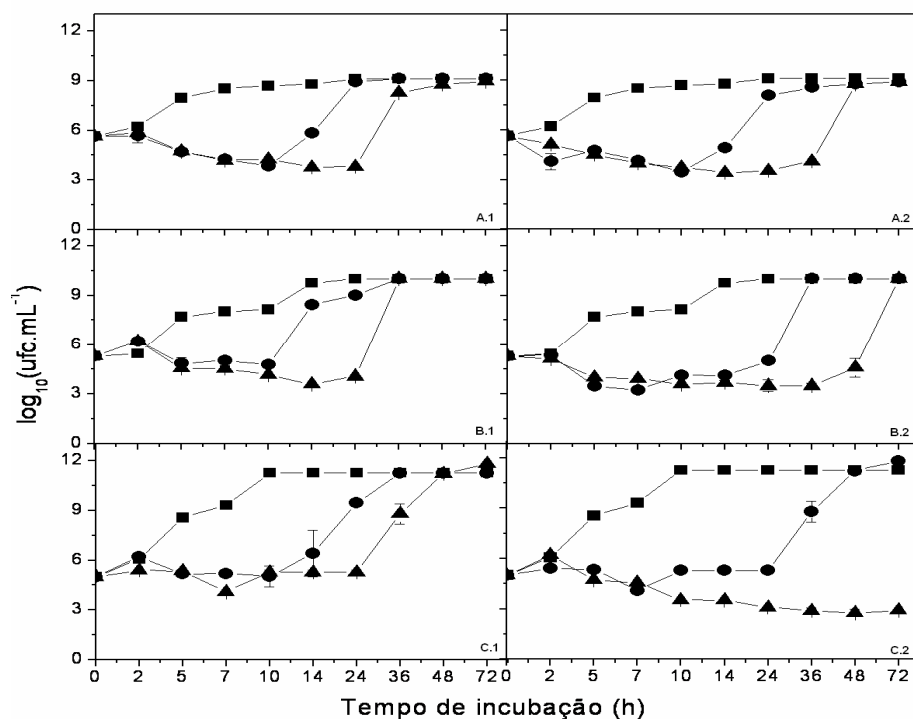
em concentrações superiores a 1 mM. A única espécie de bactéria Gram-negativa que, entre as avaliadas, apresentou sensibilidade à violaceína foi *Xanthomonas axonopodis* (CMI: 30 µM). O motivo dessa diferença está sob investigação.

Além disso, observa-se uma redução na concentração mínima inibitória da violaceína encapsulada quando comparada a violaceína livre, independente do perfil de resistência da linhagem de *S. aureus* a meticilina ou a vancomicina. Ainda observa-se que as linhagens resistentes intermediárias à vancomicina apresentam maior resistência à violaceína livre e encapsulada, possivelmente devido ao espessamento da parede celular observado nessas linhagens, o que dificultaria a difusão e penetração de compostos ou sistemas antimicrobianos. De qualquer forma, a violaceína encapsulada apresenta uma eficiência antimicrobiana em média 2 vezes maior do que a violaceína livre nas linhagens aqui estudadas, possivelmente por um efeito de penetração aumentada, visto que o sistema além de ser mais solúvel em água e fluidos biológicos em comparação à violaceína livre, a distribuição de tamanho na casa de 150 nm apresentada pelo sistema facilita a sua penetração na parede celular e na membrana plasmática.

#### 8.3.b) Curvas tempo-morte

Após a determinação das CMI, a ação da violaceína livre e encapsulada foi avaliada por experimentos de tempo-morte frente a 3 linhagens de *S. aureus*: ATCC 29213 (linhagem padrão CLSI para teste de atividade antimicrobiana de compostos), BEC9393 e Rib 1 (duas linhagens SARM de importância clínica). Os resultados estão demonstrados na Figura 4.





**Figura 4:** Curvas tempo-morte para as concentrações de 25 (A.1, B.1 e C.1) e 50  $\mu\text{M}$  (A.2, B.2 e C.2) de violaceína livre ou encapsulada contra as linhagens (A) ATCC 29213, (B) BEC 9393 e (C) Rib 1. (Legenda: ■ – controle não tratado; ● – violaceína livre; ▲ - violaceína encapsulada).

Observa-se uma clara diferença de atividade entre a violaceína livre e encapsulada nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$ . No caso da concentração de 25  $\mu\text{M}$ , é observado que tanto a violaceína livre quanto encapsulada promovem uma redução acima de 3 logs no crescimento em todas as linhagens analisadas até 10 h de incubação, sugerindo um efeito bactericida de ambas as formas da violaceína. Entretanto, após 10 h, a violaceína livre falha em conter o crescimento de todas as linhagens, enquanto a violaceína encapsulada promove um contínuo efeito bactericida até 24 h. Essa tendência é também observada na concentração de 50  $\mu\text{M}$  com tempos de incubação acima de 14 h, especialmente na linhagem ATCC 29213. Após 24 h, a violaceína livre deixa de exercer seu efeito antibacteriano e nas duas concentrações analisadas o crescimento

excede em mais de 10 logs após esse período. No caso da violaceína encapsulada, o efeito antibacteriano se mantém mesmo após 24 h, visto que recuperação de ufc permanece baixa até 36 h de incubação com a linhagem ATCC 29213, 48 h para a linhagem BEC9393 e acima de 72 h para a linhagem Rib 1. Esse efeito adiciona um outro possível mecanismo para explicar a maior eficiência da violaceína encapsulada em comparação à violaceína livre. Como a violaceína livre está 100% disponível no meio de cultura nos tempos iniciais do ensaio, esta se apresenta susceptível à degradação enzimática e por oscilações de pH, enquanto que, no caso da violaceína encapsulada, o ativo permanece protegido contra esses fatores, aumentando, portanto, a fração de violaceína ativa no meio de cultura. Além disso, a liberação sustentada (comprovada no ensaio de cinética de liberação) do composto promove um efeito antibacteriano prolongado, o que corrobora os fatos observados nas curvas tempo-morte. Dessa forma, três possíveis mecanismos que promovem melhor efeito antibacteriano da violaceína encapsulada são propostos: a maior taxa de penetração (dados os resultados de CMI), proteção do ativo contra ataques enzimáticos e oscilações de pH e liberação sustentada do ativo por tempos prolongados (dadas às observações da curva de cinética de liberação e das curvas tempo-morte).

### 8.3.c) Atividade combinada da violaceína livre e encapsulada com outros antibióticos

Possíveis interações de atividade antibacteriana da violaceína livre foram estudadas usando-se dois antibióticos  $\beta$ -lactâmios (ampicilina e oxacilina), dois inibidores de síntese protéica (estreptomicina e cloranfenicol) e um inibidor de RNA polimerase (rifampicina). Tais interações têm implicação clínica para uso de terapias

combinadas de antibióticos para tratamento de infecções persistentes ou causadas por microorganismos multiresistentes. Os resultados estão descritos na Tabela 5.

**Tabela 5: Ação combinada da violaceína livre com ampicilina, oxacilina, estreptomicina, cloranfenicol e rifampicina.**

Concentrações mínimas inibitórias (µM)						
Combinação	CMI(Vs)	CMI(Vc)	CMI(As)	CMI (Ac)	CLF	Interação
Violaceína livre + Ampicilina	15	2,8	33,7	13,5	0,6	Aditiva
Violaceína livre + Oxacilina	15	7,5	31,2	5	0,7	Aditiva
Violaceína livre + Estreptomicina	15	11,5	5,5	4,2	2,1	Indiferente
Violaceína livre + Cloranfenicol	15	3,8	12,4	2,5	0,4	Sinérgica
Violaceína livre + Rifampicina	15	0,02	0,3	$1,5 \times 10^{-4}$	0,02	Sinérgica

**Notas:**

CMI(Vs): concentração mínima inibitória da violaceína livre usada separadamente;

CMI(Vc): concentração mínima inibitória da violaceína livre usada em combinação com outro antibiótico;

CMI(As): concentração mínima inibitória do segundo antibiótico usado separadamente;

CMI(Ac): concentração mínima inibitória do segundo antibiótico usado em combinação com a violaceína livre;

CLF: índice de concentração letal fracionada.

Observa-se que a violaceína livre apresenta ação aditiva quando combinada com outros antibióticos beta-lactâmios. De fato, em nosso grupo foram observadas evidências por microscopia eletrônica de transmissão de que um dos possíveis

mecanismos de ação antimicrobiana da violaceína envolve ruptura de parede celular (Micas *et al.*, manuscrito em preparação). Uma vez que combinações entre antibióticos que atuam sobre parede celular normalmente resultam em efeitos aditivos, tais observações somadas às análises de microscopia eletrônica explicam, em parte, esse mecanismo de ação aditiva observado e fornece pistas sobre o possível mecanismo de ação antibacteriana da violaceína sobre *S. aureus*. Uma observação inesperada foi o efeito sinérgico promovido pelas combinações violaceína-cloranfenicol e violaceína-rifampicina, visto que cloranfenicol e rifampicina são dois antibióticos bacteriostáticos. Como em geral os antibióticos que agem sobre parede celular necessitam de culturas em alta taxa de divisão celular para exercer seus efeitos, comumente sua combinação com antibióticos bacteriostáticos resulta em efeitos antagônicos (Eliopolus, 1989). Tais observações sugerem que a violaceína ative distintos e concomitantes mecanismos de toxicidade, como já foi observado nos mecanismos de ação da violaceína sobre células tumorais, que podem envolver distintas sinalizações de apoptose mediadas por TNF e Akt e produção de espécies reativas de oxigênio (de Carvalho *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2004; Kodach *et al.*, 2006).

O mesmo tipo de ensaio foi realizado com a violaceína encapsulada. Os resultados estão descritos na Tabela 6.

**Tabela 6: Ação combinada da violaceína encapsulada com ampicilina, oxacilina, estreptomicina, cloranfenicol e rifampicina.**

Concentrações mínimas inibitórias ( $\mu\text{M}$ )						
Combinação	CMI(VEs)	CMI(VEc)	CMI(As)	CMI (Ac)	CLF	Interação
Violaceína encapsulada + Ampicilina	5,8	2,4	33,7	2,3	0,51	Aditiva
Violaceína encapsulada + Oxacilina	5,8	3,5	31,2	0,2	0,68	Aditiva
Violaceína encapsulada + Estreptomicina	5,8	1,8	5,5	0,34	0,37	Sinérgica
Violaceína encapsulada + Cloranfenicol	5,8	0,8	12,4	3,7	0,44	Sinérgica
Violaceína encapsulada + Rifampicina	5,8	$4 \times 10^{-3}$	0,3	$3,5 \times 10^{-4}$	$7,8 \times 10^{-5}$	Sinérgica

**Notas:**

CMI(VEs): concentração mínima inibitória da violaceína encapsulada usada separadamente;

CMI(VEc): concentração mínima inibitória da violaceína encapsulada usada em combinação com outro antibiótico;

CMI(As): concentração mínima inibitória do segundo antibiótico usado separadamente;

CMI(Ac): concentração mínima inibitória do segundo antibiótico usado em combinação com a violaceína encapsulada;

CLF: índice de concentração letal fracionada.

Observa-se que em termos de interação com  $\beta$ -lactâmios, da mesma forma que foi observado nos ensaios de combinação da violaceína livre, há um aditismo entre a violaceína encapsulada com ampicilina e oxacilina. O resultado mais interessante é a interação com estreptomicina que, no caso da violaceína livre, não há interação significativa, enquanto no caso da violaceína encapsulada a interação passou a ser

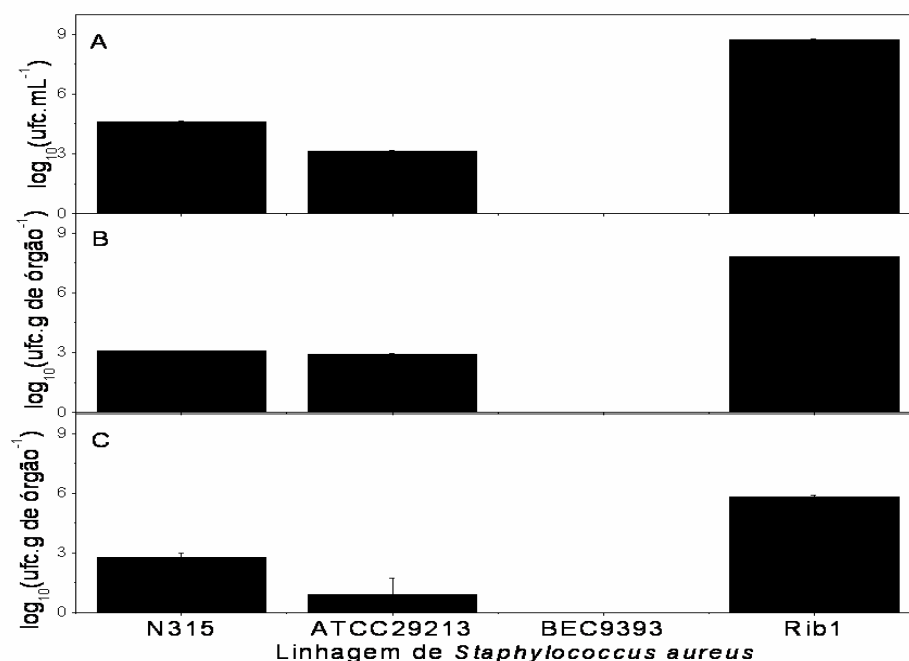
sinérgica. Uma possível explicação para esse fato é uma interação da estreptomicina com a superfície externa das nanopartículas via grupamentos amino protonados do antibiótico ( $-\text{NH}_3^+$ ) com os grupos carboxílicos terminais do PLGA. Tal interação promoveria uma penetração aumentada da estreptomicina nas células bacterianas, visto que aparentemente o sistema aqui apresentado possui efeito de penetração em parede celular. Entretanto, nos controles experimentais em que doses de estreptomicina foram ministradas concomitantemente com concentrações crescentes de nanopartículas sem violaceína não foram observados efeitos aditivos ou sinérgicos, sugerindo que o arrasto da estreptomicina por interação com a superfície externa das nanopartículas não é o responsável pelo efeito observado. Logo, há um mecanismo diferenciado de sinergismo, provavelmente decorrente de uma diferença no mecanismo de toxicidade promovido pela violaceína encapsulada. Investigações futuras necessitarão serem conduzidas para explicar melhor esse efeito.

Apesar dos mecanismos de interação entre as formas livre e encapsulada da violaceína permanecerem desconhecidos, tais dados apresentam importância clínica para terapia antimicrobiana combinada contra infecções sistêmicas.

#### 8.4) Estabelecimento do modelo murino de infecção por *S. aureus*

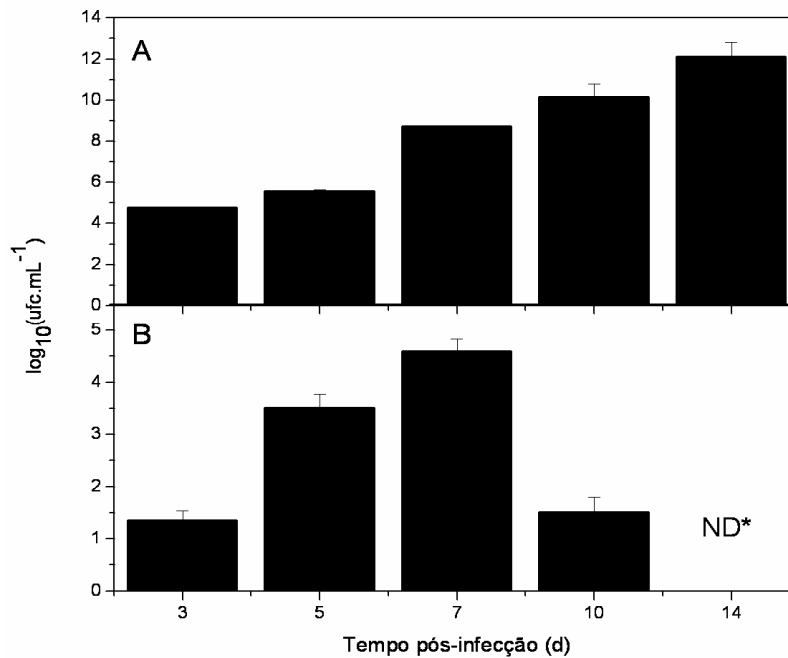
Os resultados da infecção sistêmica por diferentes linhagens de *S. aureus* após 7 dias de infecção nos animais C3H Nude estão demonstrados na Figura 5. Observa-se que diferentes linhagens de *S. aureus* apresentam cinéticas de crescimento e colonização distintas. Nos experimentos realizados, observou-se que a linhagem BEC9393 não foi capaz de promover colonização eficiente e reprodutível no modelo aqui testado, enquanto que as linhagens N315, ATCC29213 e Rib1 são capazes de colonizar

eficazmente os animais. Observa-se ainda que, no caso dessas linhagens, Rib1 atinge taxas mais altas de bacteremia em comparação às linhagens N315 e ATCC29213. Tal diferença pode ser resultante do fato de que N315 e ATCC 29213 já são linhagens cultivadas por longos períodos em laboratório, sendo repassadas de laboratório em laboratório, o que poderia acarretar uma seleção em que fatores de virulência e colonização do hospedeiro foram selecionados negativamente. Uma vez que a linhagem Rib 1 não sofreu tal processo, esta apresenta-se mais adaptada à colonização de hospedeiros. Entretanto, mesmo a infecção por Rib 1 não demonstrou-se fatal após 20 dias de infecção, apesar da infecção se apresentar persistente e não auto-regulada. Devido a essa pronunciada diferença de colonização e pelo fato de ser uma linhagem MRSA, a linhagem Rib 1 (que atinge taxas de bacteremia na casa de 5 logs em 3 dias) foi selecionado como linhagem padrão para infecção sistêmica e testes da atividade antimicrobiana da violaceína livre e encapsulada *in vivo*.



**Figura 5:** Valores de ufc detectados no (A) sangue, (B) fígado e (C) baço de animais C3H Nude infectados com diferentes linhagens de *S. aureus* após 7 dias de infecção.

Ainda, devido a esses resultados, a linhagem Rib 1 foi selecionada para tentativas de infecção sistêmica em modelo murino imunocompetente, utilizando-se para esses testes a linhagem Balb/C Uni. Os testes comparativos de acompanhamento periódico de infecção por Rib 1 nos modelos C3H Nude e Balb/C Uni estão demonstrados na Figura 6.



**Figura 6: Progressão da infecção pela linhagem Rib 1 de *S. aureus* nas linhagens murinas (A) C3H Nude e (B) Balb/C Uni. (Nota: ND – título não detectável).**

Observa-se uma clara diferença no curso da infecção dos animais C3H Nude em comparação aos animais Balb/C. Primeiramente, a recuperação de ufc no modelo C3H Nude é muito maior em comparação à linhagem Balb/C durante todo o tempo analisado. Ainda, observa-se que a infecção no modelo C3H Nude é persistente e atinge títulos de 12 logs após 14 dias de infecção, enquanto que a infecção dos animais Balb/C atinge um pico em 7 dias e passa a ser resolvida após esse tempo, atingindo títulos não detectáveis após 14 dias. A explicação para esse fenômeno é a imunidade adaptativa,

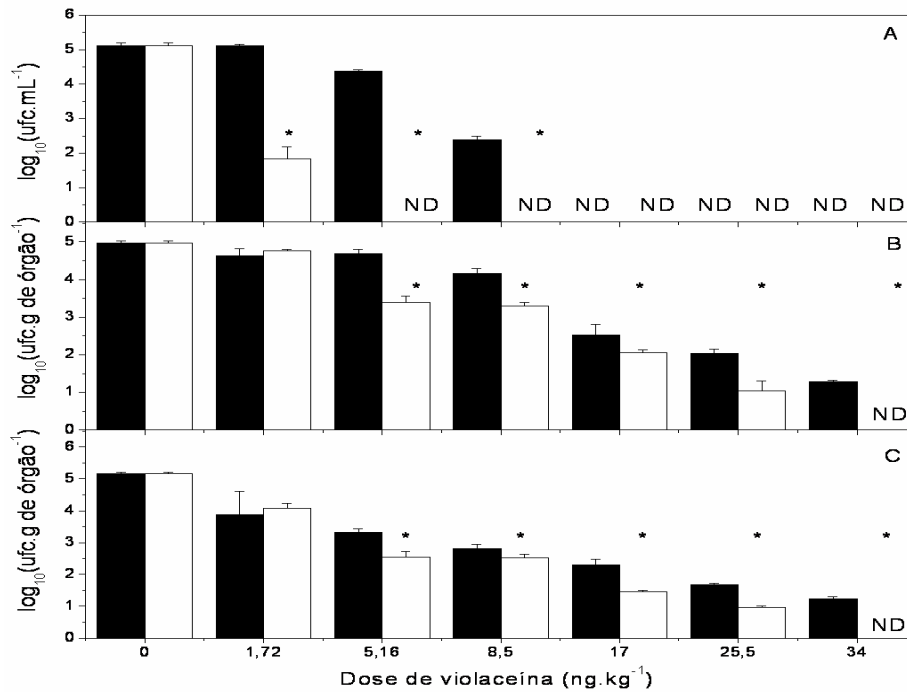


ausente nos animais C3H Nude (visto que esta linhagem é timo deficiente e, portanto, a resposta coordenada por linfócitos T é ausente) e presente nos animais Balb/C. Apesar de tais resultados, vale-se frisar que em nenhum dos modelos analisados observou-se morte dos animais experimentais devido à infecção.

#### 8.5) Atividade antimicrobiana in vivo da violaceína livre e encapsulada

As Figuras 7 e 8 mostram os resultados da atividade antibacteriana da violaceína livre e encapsulada em modelo murino C3H Nude e Balb/C Uni, respectivamente, seguindo-se as condições experimentais de inoculação dos animais para estabelecimento da infecção e com dois tratamentos. O uso de 2 doses por animal foi padronizado após demonstrado de que doses únicas de violaceína livre administradas após 4 h de infecção promovem um comportamento randômico na recuperação de ufc dos animais infectados (dados não mostrados).

Como pode ser observado nos dados apresentados nas Figuras 7 e 8, tanto a violaceína livre quanto encapsulada apresentam uma atividade dose-resposta nos modelos animais aqui descritos. Ainda, a violaceína encapsulada apresenta um perfil de ação mais eficaz em termos de eliminação da infecção no sangue, sendo necessária uma quantidade de  $5,16 \text{ ng.kg}^{-1}$  para reduzir a contagem de ufc a níveis não detectáveis no modelo C3H Nude, enquanto que é necessária uma quantidade de  $8,5 \text{ ng.kg}^{-1}$  de violaceína livre para promover efeito similar na corrente sanguínea. No caso do modelo Balb/C Uni, é necessária uma quantidade de  $8,5 \text{ ng.kg}^{-1}$  de violaceína encapsulada para remoção de mais de 99% da infecção no sangue, enquanto quantidades de  $25,5 \text{ ng.kg}^{-1}$  de violaceína livre são necessárias para promover efeitos similares.

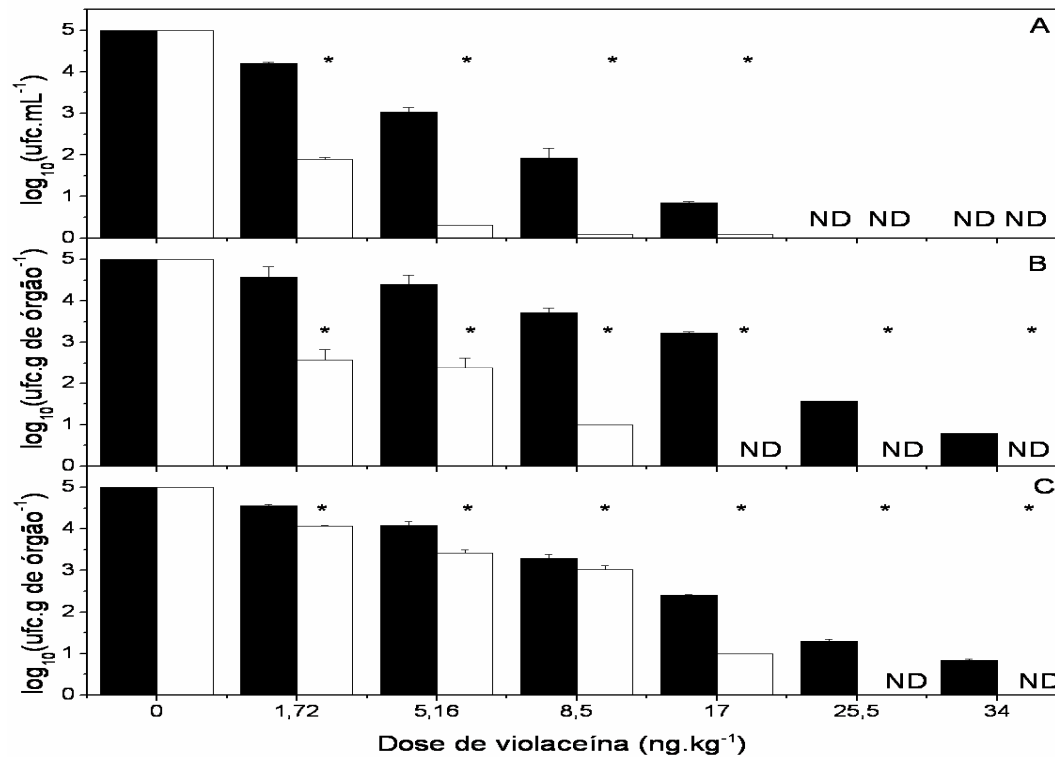


**Figura 7: Tratamento de animais C3H Nude infectados com a linhagem Rib 1 de *S. aureus* e tratados com duas doses de violaceína livre (barras negras) ou encapsulada (barras brancas) após 4 e 22 h de infecção. Os gráficos A, B e C correspondem às quantidades de ufc recuperadas do sangue, fígado e baço, respectivamente. As diferenças estatisticamente significantes entre o tratamento pela violaceína livre e encapsulada estão marcadas \* (Nota: ND: título não detectável).**

Ainda, observa-se que nas concentrações de 1,72 ng.kg<sup>-1</sup> os efeitos das duas formas são bastante similares em termos de eliminação de ufc no fígado e baço dos animais infectados. Em quantidades mais altas (acima de 8,5 ng.kg<sup>-1</sup>), nota-se uma eficiência maior da violaceína encapsulada, sendo que em concentrações de 34 ng.kg<sup>-1</sup> a violaceína encapsulada promove a redução da recuperação de ufc a níveis não detectáveis nos dois órgãos citados em animais C3H Nude, enquanto nos animais Balb/C Uni quantidades de 25,5 ng.kg<sup>-1</sup> de violaceína encapsulada promovem eliminação completa da infecção no baço e fígado. Tal efeito é observado para a violaceína livre em doses acima de 50 ng.kg<sup>-1</sup> nos dois modelos testados (dados não mostrados). Essa diferença pode ser resultante de algumas variáveis, sendo a primeira

delas o aumento da biodisponibilidade de violaceína quando esta se encontra encapsulada, vista a solubilidade pronunciada do complexo em água. Ainda, outro fator importante é o uso do tensoativo Pluronic F68 na preparação. Relatos da literatura demonstram que a biodisponibilidade de sistemas de liberação sustentada é proporcional à sua capacidade de escape de células fagocíticas, tais como macrófagos intraperitoniais e circulantes, células de Kupfer e macrófagos esplênicos (Romberg *et al.*, 2008). Tal fenômeno é bem descrito para os chamados lipossomos de primeira geração, os quais eram facilmente fagocitados por células do sistema imune e, como consequência, a eficiência terapêutica de tais compostos era diminuída drasticamente. Nesse contexto, foram criados os lipossomos e nanopartículas furtivas, que são construídas com a adição de tensoativos derivados de poli-etilenoglicol (dentre os quais se encaixa o Pluronic F68) ou anexados à sua superfície por reações de funcionalização ou simples adsorção (Fontana *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2007) ou ainda, mais recentemente descrita, pela criação de domínios glicoconjugados (Agrawal *et al.*, 2007). Essas cadeias anexas promovem um impedimento estérico na formação dos pseudópodes de células fagocíticas e, como consequência, o sistema de liberação sustentada escapa da fagocitose. Complementarmente, a presença de agentes furtivos promovem diminuição da adsorção de proteínas plasmáticas na superfície externa das nanopartículas, dificultando a opsonização de suas superfícies por anticorpos IgG e frações C3b e C3bi do sistema complemento, resultando em redução do processo de fagocitose (Romberg *et al.*, 2008). Tal efeito é variável dependendo do processo de obtenção do sistema, contudo reduções na taxa de fagocitose por macrófagos intraperitoniais de até 5 vezes já foram descritas (Yang *et al.*, 2007; Agrawal *et al.*, 2007). Dessa forma, o uso do agente Pluronic F68 responde em parte pela maior

eficiência do sistema aqui obtido *in vivo*, sendo necessária menor quantidade de doses do composto ativo para obtenção de um efeito terapêutico otimizado.



**Figura 8:** Tratamento de animais Balb/C Uni infectados com a linhagem Rib 1 de *S. aureus* e tratados com duas doses de violaceína livre (barras negras) ou encapsulada (barras brancas) após 4 e 22 h de infecção. Os gráficos A, B e C correspondem às quantidades de ufc recuperadas do sangue, fígado e baço, respectivamente. As diferenças estatisticamente significantes entre o tratamento pela violaceína livre e encapsulada estão marcadas \* (Nota: ND: título não detectável).

Contudo, o aumento de biodisponibilidade pode se tornar um fator de risco caso as doses não sejam finamente reguladas, visto que o tamanho nanométrico das partículas obtidas aumenta também o efeito de penetração destas em células e, conseqüentemente, efeitos colaterais podem ser observados após o uso de muitas doses do sistema em questão. Ainda, devido ao aumento da permanência do complexo em circulação e

liberação sustentada do mesmo, efeitos de sobrecarga hepática podem ocorrer com um número excessivo de doses. De fato, em nossos experimentos foram observados casos de toxicidade sistêmica quando os animais foram tratados com mais de três doses de violaceína encapsulada com intervalos menores que 36 h entre os tratamentos, enquanto que, quando os animais foram tratados com menor quantidade de doses, porém com concentrações maiores em cada uma delas, esse efeito é suprimido. Por esse fato, os resultados aqui descritos foram obtidos com uso de no máximo duas doses do complexo e concentrações crescentes em cada uma delas. Logo, um estudo de farmacocinética complementar deve ser conduzido para a regulação da dose baseada na biodisponibilidade do complexo.

## 9. CONCLUSÕES

O encapsulamento da violaceína em matrizes de PLGA mostrou-se viável com parâmetros físico-químicos bastante satisfatórios que asseguram a estabilidade do sistema durante processos de estocagem e armazenamento. O sistema aqui obtido e otimizado apresenta altas taxas de rendimento e encapsulamento de violaceína e uma atividade antibacteriana consideravelmente mais alta do que a forma livre da violaceína, com a grande vantagem de poder ser disperso e administrado em soluções aquosas sem a necessidade do uso de agentes tóxicos como veículo, tal como DMSO. Ainda, o sistema apresenta atividade tanto *in vitro* quanto *in vivo* contra diferentes linhagens de *S. aureus*, incluindo linhagens SARM e SAIV e pode ser utilizado em combinação com outros antibióticos, vistas as interações sinérgicas com estreptomicina, cloranfenicol e rifampicina. Tais resultados tornam esse sistema interessante para futuros estudos de farmacocinética e possível terapia antimicrobiana e outras aplicações tais como

antitumoral e antiparasítica. Além disso, os presentes estudos de interação entre violaceína livre ou encapsulada com outros antibióticos podem fornecer pistas sobre o(s) mecanismo(s) de atividade antibacteriana dessas formulações, visto que tal fenômeno permanece não completamente esclarecido. Contudo, estudos complementares de biodisponibilidade *in vivo* da violaceína administrada em nanoformulação bem como análise comparativa da toxicidade entre as formas livre e encapsulada desse composto frente a linhagens celulares como hepatócitos e células renais devem ser futuramente conduzidos para reforçar o uso de tal sistema como agente antibacteriano.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelwahed W, Degobert G, Fessi H (2006). Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 63, 87-94.
- Agrawal P, Gupta U, Jain NK (2007). Glycoconjugated peptide dendrimers-based nanoparticulate system for the delivery of chloroquine phosphate. *Biomaterials*, 28, 3349-59.
- Apisarnthanarak A, Kiratisin P, Saifon P, Kitphati R, Dejsirilert S, Mundy LM (2007). Clinical and molecular epidemiology of community-onset, extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* infections in Thailand: a case-case-control study. *Am. J. Infect. Control.*, 35, 606-12.
- Ansari MJ, Kohli K, Dixit N (2008). Microemulsions as potential drug delivery systems: a review. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, 62, 66-79.
- Bernard BK, Nakamura Y, Aihara K, Mennear JH (2005). Studies of the toxicological potential of tripeptides (L-valyl-L-prolyl-L-proline and L-isoleucyl-L-prolyl-L-proline): IX. Evaluation of the mutagenic potential of synthesized L-valyl-L-prolyl-L-proline in the *Salmonella-Escherichia coli*/microsome, incorporation assay. *Int. J. Toxicol.*, 4, 107-13.
- Buke C, Armand-Lefevre L, Lolom I, Guerinot W, Deblangy C, Ruimy R, Andremont A, Lucet JC (2007). Epidemiology of multidrug-resistant bacteria in patients with long hospital stays. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 28, 1255-60.
- Bromberg N, Justo GZ, Haun M, Durán N, Ferreira CV (2005). Violacein cytotoxicity on human blood lymphocytes and effect on phosphatases. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 20, 449-54.

- Clinical Laboratory Standards Institute* – CLSI (2003). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; 6<sup>a</sup> edição. CLSI, 2003; EUA.
- De Carvaho DD, Costa FT, Durán N, Haun M (2006). Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells. *Toxicol. In Vitro, in press*.
- Demling RH & Waterhouse B (2007). The Increasing Problem of Wound Bacterial Burden and Infection in Acute and Chronic Soft-Tissue Wounds Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Burns Wounds*, 7, 89-98.
- Durán N, Menck CF (2001). *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. *Crit. Rev. Microbiol.*, 27:, 201-22.
- Durán N, Justo GZ, Melo PS, De Azevedo MB, Brito AR, Almeida AB, Haun M (2003). Evaluation of the antiulcerogenic activity of violacein and its modulation by the inclusion complexation with beta-cyclodextrin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 81, 387-96.
- Durán N, Gimenez IF, Anazetti MC, Melo PS, Haun M, De Azevedo MMM, Alves OL (2005). Cytotoxicity on V79 and HL60 cell lines by thiolated-beta-cyclodextrin-Au/violacein nanoparticles. *J. Biom. Nanotechnol.* 1: 352-8.
- Durán N, Justo GZ, Ferreira CV, Melo PS, Cordi L, Martins D (2007). Violacein: properties and biological activities. *Biotechnol Appl Biochem.*, 48, 127-33.
- Durán N, Marcato PD, Buffo CM, de Azevedo MM, Esposito E (2007). Poly (epsilon-caprolactone)/propolis extract: microencapsulation and antibacterial activity evaluation. *Pharmazie* 62, 287-90.
- US Food and Drug Administration – FDA. Disponível em [www.fda.gov](http://www.fda.gov); acesso:20/11/2008.



- Eliopolus GM (1989). Synergism and antagonism. *Infect. Dis. Clin. North. Am.*, 3, 399-406.
- Ferreira CV, Bos CL, Versteeg HH, Justo GZ, Durán N, Peppelenbosch MP (2004). Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. *Rev. Blood*, 104: 1459-1464.
- Fessi H, Devissaguet JP, Puisieux F, Thies C. Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanoparticules. European Patent n° 0275796 B1. 1987.
- Fontana G, Licciardi M, Mansueto S, Schillaci D, Giammona G (2001). Amoxicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: influence of PEG coating on the particle size, drug release rate and phagocytic uptake. *Biomaterials*, 22, 2857-65
- Ganea GM, Sabliov CM, Ishola AO, Fakayode SO, Warner IM (2008). Experimental design and multivariate analysis for optimizing poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticle synthesis using molecular micelles. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 8, 280-92.
- Hughes D (2003). Exploiting genomics, genetics and chemistry to combat antibiotic resistance. *Nat. Rev. Genet.*, 4, 432-41.
- Jain KK (2008). Drug delivery systems - an overview. *Methods Mol. Biol.*, 437, 1-50
- (a)
- Jain KK (2008). Recent advances in nanoecology. *Technol. Cancer Res. Treat.*, 7, 1-13
- (b).
- Jarvis WR (2007). The Lowbury Lecture. The United States approach to strategies in the battle against healthcare-associated infections, 2006: transitioning from benchmarking to zero tolerance and clinician accountability. *J. Hosp. Infect.*, 65, 3-9.

- Jeong YI, Shim YH, Kim C, Lim GT, Choi KC, Yoon C (2005). Effect of cryoprotectants on the reconstitution of surfactant-free nanoparticles of poly(DL-lactide-co-glycolide). *J. Microencapsul.*, 22, 593-601.
- Kodach LL, Bos CL, Durán N, Peppelenbosch MP, Ferreira CV, Hardwick JC (2006). Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*, 27:508-16.
- Konzen M, De Marco D, Cordova CA, Vieira TO, Antônio RV, Creczynski-Pasa TB (2006). Antioxidant properties of violacein: possible relation on its biological function. *Bioorg. Med. Chem.*, 14, 8307-13.
- Kokai-Kun JF, Chanturiya T, Mond JJ (2007). Lysostaphin as a treatment for systemic *Staphylococcus aureus* infection in a mouse model. *J. Antimicrob. Chemother.*, 60,1051-9.
- Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, Lian J, Ito T, Kanamori M, Matsumaru H, Maruyama A, Murakami H, Hosoyama A, Mizutani-Ui Y, Takahashi NK, Sawano T, Inoue R, Kaito C, Sekimizu K, Hirakawa H, Kuhara S, Goto S, Yabuzaki J, Kanehisa M, Yamashita A, Oshima K, Furuya K, Yoshino C, Shiba T, Hattori M, Ogasawara N, Hayashi H, Hiramatsu K (2001). Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 357, 1225-40.
- Lee AL, Wang Y, Ye WH, Yoon HS, Chan SY, Yang YY (2008). Efficient intracellular delivery of functional proteins using cationic polymer core/shell nanoparticles. *Biomaterials* 29, 224-32.

- Leon LL, Miranda CC, De Souza AO, Durán N (2001). Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. J. Antimicrob. Chemother., 48: 449-50.
- Lipsky BA, Weigelt JA, Gupta V, Killian A, Peng MM (2007). Skin, soft tissue, bone, and joint infections in hospitalized patients: epidemiology and microbiological, clinical, and economic outcomes. Infect. Control. Hosp. Epidemiol., 28, 1290-8.
- Marcato PD, Durán N (2008). New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. J. Nanosci. Nanotechnol., 8, 1-4.
- Mwangi MM, Wu SW, Zhou Y, Sieradzki K, de Lencastre H, Richardson P, Bruce D, Rubin E, Myers E, Siggia ED, Tomasz A (2007). Tracking the *in vivo* evolution of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* by whole-genome sequencing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 9451–6.
- Melo PS, Justo GZ, de Azevedo MB, Durán N, Haun M (2003). Violacein and its beta-cyclodextrin complexes induce apoptosis and differentiation in HL60 cells. Toxicology, 186, 217-25.
- Mosqueira VC, Legrand P, Pinto-Alphandary H, Puisieux F, Barratt F (2000). Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. J. Pharm. Sci., 89, 614-26.
- Nair LS, Laurencin CT (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. Progr. Polym. Sci., 32, 762-98.
- Matz C, Deines P, Boenigk J, Arndt H, Ebert J, Kjelleberg S, Jurgens K (2004). Impact of violacein-producing bacterial on survival and feeding of Bacteriovorous nanoflagellates. Appl. Environ. Microbiol., 70, 1593-9.

- Pantanella F, Berlutti F, Passariello C, Sarli S, Morea C, Schippa S (2007). Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. J. Appl. Microbiol., 102:992-9.
- Prabaharan M (2008). Review paper: chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery. J. Biomater. Appl., 23, 5-36.
- Ravenelle F, Gori S, Le Garrec D, Lessard D, Luo L, Palusova D, Sneyd JR, Smith D (2008). Novel lipid and preservative-free propofol formulation: properties and pharmacodynamics. Pharm. Res., 25, 313-9.
- Rettori D & Durán N (1998). Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. World J. Microb. Biot., 14: 685-8.
- Romberg B, Hennink WE, Storm G (2008). Sheddable coatings for long-circulating nanoparticles. Pharm. Res., 25, 55-71.
- Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas LL, Pohlmann AR. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. Quím. Nova, 26: 726 - 737, 2003.
- Strateva T, Ouzounova-Raykova V, Markova B, Todorova A, Marteva-Proevska Y, Mitov I (2007). Problematic clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the university hospitals in Sofia, Bulgaria: current status of antimicrobial resistance and prevailing resistance mechanisms. J. Med. Microbiol., 56, 956-63.
- Takashima Y, Saito R, Nakajima A, Oda M, Kimura A, Kanazawa T, Okada H (2007). Spray-drying preparation of microparticles containing cationic PLGA nanospheres as gene carriers for avoiding aggregation of nanospheres. Int. J. Pharm., 343, 262-9.

- Yang LH, Xiong H, Lee OO, Qi SH, Qian PY (2007). Effect of agitation on violacein production in *Pseudoalteromonas luteoviolacea* isolated from a marine sponge. *Lett. Appl. Microbiol.*, 44, 625-30.
- Yang A, Yang L, Liu W, Li Z, Xu H, Yang X (2007). Tumor necrosis factor alpha blocking peptide loaded PEG-PLGA nanoparticles: preparation and in vitro evaluation. *Int. J. Pharm.*, 331, 123-32.
- Westedt U, Kalinowski M, Wittmar M, Merdan T, Unger F, Fuchs J, Schaller S, Bakowsky U, Kissel T (2007). Poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for local delivery of paclitaxel for restenosis treatment. *J. Control. Rel.*, 119, 41-51.
- World Health Organization (WHO). Disponível em [www.who.int](http://www.who.int); Acesso: 20/11/2008.

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado/Doutorado intitulada “**Atividade antimicrobiana da violaceína pura ou em nanoformulação**”,

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

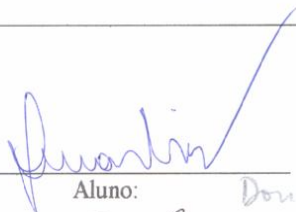
( ) está inserido no **Projeto CIBio/IB/UNICAMP** (Protocolo nº \_\_\_\_\_), intitulado \_\_\_\_\_;

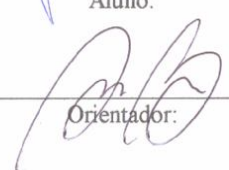
( X ) tem autorização da **Comissão de Ética em Experimentação Animal/IB/UNICAMP** (Protocolos nº 1619-1 e 1730-1, 2008);

( ) tem autorização do **Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos/FCM/UNICAMP** (Protocolo nº \_\_\_\_\_);

( ) tem autorização de comissão de bioética ou biossegurança externa à UNICAMP.


Especificar: \_\_\_\_\_

  
\_\_\_\_\_  
Aluno: Doune Matheus Jr

  
\_\_\_\_\_  
Orientador: Marcelo Brochi

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido

  
\_\_\_\_\_  
Nome: \_\_\_\_\_  
Função: Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO  
Presidente  
Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/IB - UNICAMP



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/Unicamp

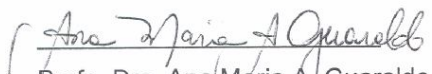
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1730-1, sobre "Avaliação da atividade antimicrobiana da violaceína pura ou em nanoformulação", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Marcelo Brocchi / Dorival Martins Junior, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 15 de dezembro de 2008.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1730-1, entitled "Evaluation of the antibacterial activity of free and nanoparticles-loaded violacein", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on December 15, 2008.

Campinas, 15 de dezembro de 2008.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/Unicamp**

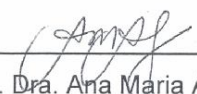
**CERTIFICADO**

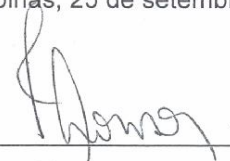
Certificamos que o Protocolo nº **1619-1**, sobre "**Atividade antimicrobiana da violaceína pura ou em nanoformulação**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Marcelo Brocchi / Dorival Martins Junior**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **15 de setembro de 2008**.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº **1619-1**, entitled "**Antimicrobial activity of violacein free or in nanoparticles**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **September 15, 2008**.

Campinas, 25 de setembro de 2008.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva